

Aus der klinischen Kooperationseinheit Dermatoonkologie des Deutschen
Krebsforschungszentrums (DKFZ) an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und
Allergologie der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Leiter: Prof. Dr. med. Jochen Utikal)

Analyse der Interaktion von T-Lymphozyten und eosinophilen
Granulozyten auf Gewebeschnitten primärer Melanome, assoziierter
Metastasen sowie korrespondierender melanozytärer Naevi

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu Heidelberg

vorgelegt von
Josephine Eve Barthels

aus
Bad Homburg v.d. Höhe
2020

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerdts

Referent: Prof. Dr. med. Jochen Utikal

Betreuer: Prof. Dr. med. Christoffer Gebhardt

*Meinen Eltern und meinem Freund in
Liebe und Dankbarkeit gewidmet.*

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Die Haut und ihr melanozytäres System.....	3
1.2 Das Maligne Melanom	4
1.3 Immunzell-Infiltration des Tumors	5
1.4 Der eosinophile Granulozyt.....	8
1.5 Lymphozytäre und eosinophile, immunhistochemische Marker	13
1.5.1 CD8	13
1.5.2 CD69	14
1.5.3 CD44	15
1.5.4 ECP	17
1.5.5 EPX	18
1.6 Ziele der Dissertation	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 Studienkonzept	21
2.2 Patientenkollektiv	21
2.3 Histologische Methoden zur Herstellung eines Tissue-Microarrays und Immunhistochemie (IHC).....	22
2.4 Mikroskopisch-gestützte Auswertung der TMA Analyse	26
2.5 Bildanalyse.....	28
2.6 Statistische Auswertung.....	29
3 ERGEBNISSE.....	32
3.1 Einführung.....	32
3.2 Marker CD8.....	35
3.2.1 Intratumorale Expression	36
3.2.2 Expression in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden	37

3.3	Marker CD69	38
3.3.1	Intratumorale Expression	39
3.3.2	Expression in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden	40
3.4	Marker CD44	41
3.4.1	Intratumorale Expression	41
3.4.2	Expression in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden	42
3.5	Marker ECP	43
3.5.1	Intratumorale Expression	44
3.5.2	Expression in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden	45
3.6	Marker EPX	46
3.6.1	Intratumorale Expression	47
3.6.2	Expression in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden	48
4	DISKUSSION	50
4.1	Forschungsstand	50
4.2	Einordnung eigener Ergebnisse	58
4.3	Ausblick	63
5	ZUSAMMENFASSUNG	65
6	LITERATURVERZEICHNIS	67
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	87
8	TABELLENVERZEICHNIS	88
7	LEBENS LAUF	89
8	DANKSAGUNG	90

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACT	<i>Adoptive cell transfer</i> (adoptiver Zelltransfer)
AJCC	<i>American Joint Committee of Cancer</i>
ALM	Akro-lentiginöses Melanom
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
°C	Grad Celcius
CCL5	<i>Chemokine ligand 5 protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD3	Gewebsmarker für T-Zellen
CD4	Gewebsmarker für T-Helferzellen
CD45RO	Gewebsmarker für T-Gedächtniszellen
CD8	Gewebsmarker für Zytotoxische T-Zellen
CD25	Gewebsmarker für regulatorische T-Zellen und Aktivierungsmarker für T-Lymphozyten
CD39	<i>Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1</i>
CD44	Aktivierungsmarker für eosinophile Granulozyten
CD69	Aktivierungsmarker für eosinophile Granulozyten
CXCL9	<i>Chemokine ligand 9 protein</i>
CXCL10	<i>Chemokine ligand 10 protein</i>
ECP	<i>Eosinophil cationic protein</i>
EDN	<i>Eosinophile derived neurotoxin</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EPX	<i>Eosinophil peroxidase</i>
FOXP3	Protein in regulatorischen T-Zellen
GBA	Gemeinsamer Bundesausschuss
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMGB1	<i>High mobility group box 1 protein</i>
HMB45	<i>Human Melanoma Black 45</i>
IDO	<i>Indoleamine-pyrrole 1,3-dioxygenase</i>
IgE	<i>Immunglobulin E</i>
IHC	Immunhistochemie
IL-1b	Interleukin 1b
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-13	Interleukin 13
IL-23	Interleukin 23
INF-γ	Interferon γ
Ki67	Zellproliferationsmarker
LMM	Lentigo-Maligna Melanom
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MET	Melanommetastase
MBP	<i>Major basic protein</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter

µg	Mikrogramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mm	Millimeter
MET	Metastase
MET distant	Fernmetastasen
MET loco-reg	Regionale Metastasen
MM	Malignes Melanom
MM non met	Nicht metastasiertes Malignes Melanom
MM met	Metastasiertes Malignes Melanom
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NCT	Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen Heidelberg
NM	Noduläres Melanom
NKR-P1	Signaltransduktionsprotein in natürlichen Killerzellen
NO	Stickoxid
NZN	Naevuszellnävus
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PD	<i>Photodamage</i> (Photoschaden/Lichtschaden)
PD1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDL-1	<i>Programmed death ligand 1</i>
PFS	<i>Progression-free survival</i> (Progressionsfreies Überleben)
pHH3	phosphoryliertes Histon H3 (Ser10)
PRIM	Primarius
p53	Tumorsuppressor p53
RNAse 3	Ribonuklease 3
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffradikale)
Siglec-F	<i>Sialic acid-binding Ig-like lectin F</i>
Siglec-8	<i>Sialic acid-binding Ig-like lectin 8</i>
SSM	Superfiziell-spreitendes Melanom
S100B	Tumormarker für Malignes Melanom
TAM	<i>Tumor associated macrophages</i> (Tumor assoziierte Makrophagen)
TABE	<i>Tumor associated blood eosinophilia</i> (Tumor assoziierte Bluteosinophilie)
TATE	<i>Tumor associated tissue eosinophilia</i> (Tumor assoziierte Gewebseosinophilie)
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Th1	T-1-Helferzellen
Th2	T-2-Helferzellen
TIL	<i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i> (Tumor-infiltrierende Lymphozyten)
TMA	<i>Tissue-Microarray</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
UCM	<i>Unclassifiable Melanoma</i> (nicht klassifizierbares Melanom)
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
WHO	<i>World Health Organisation</i>
%	Prozent

1 EINLEITUNG

1.1 Die Haut und ihr melanozytäres System

Die Haut ist das größte und funktionell vielfältigste Organ des menschlichen Körpers, den sie vollständig umhüllt. Sie hat eine Gesamtfläche von ca. 1,8 m² sowie eine Dicke von ca. 1-2 cm. Die Haut setzt sich aus verschiedenen Schichten zusammen, die von der Oberfläche bis in die Tiefe als Epidermis, Dermis und Subkutis bezeichnet werden. Die wichtigsten Funktionen der Haut sind vor allem der Schutz des Organismus vor Umwelteinflüssen, wie Strahlung, Austrocknung und Chemikalien. Die Haut schützt zudem vor Krankheitserregern und ist damit auch ein zentrales Immunorgan. Außerdem dient die Haut der Wärmeregulierung, der Sinneswahrnehmung Sensibilität und auch der Synthese von Vitamin D.

Melanozytäre Naevi sind die häufigste Neoplasie der Haut bei hellhäutigen Menschen und per definitionem benigne. Ausgehend von Melanozyten, Zellen, die in der Epidermis liegen und das Pigment Melanin synthetisieren, können sie verschiedene Erscheinungsformen annehmen. Gewöhnliche melanozytäre Naevi zeichnen sich durch ihre symmetrische Form, scharfe Begrenzung und regelmäßige Pigmentierung aus. Sie können an Hand ihres klinischen Aussehens sowie ihrer Histologie in die Lentigo simplex, die initiale Entwicklungsform eines Naevus, in die Naevi vom Junktions- und Compoundtyp und in den dermalen Naevus unterteilt werden. Weitere Formen sind der Halo Naevus, Spitz Naevus sowie der Naevus coeruleus. (Hauschild et al. 2011)

Atypische melanozytäre Naevi zeigen im Vergleich zu gewöhnlichen Naevi eine Asymmetrie, eine unscharfe Begrenzung, Auffälligkeiten in der Pigmentierung sowie einen Durchmesser größer als 5mm. Maligne Melanome können auf dem Boden eines atypischen Naevus entstehen, sodass eine hohe Anzahl atypischer Naevi mit einem erhöhten Risiko ein Melanom zu entwickeln einhergeht.

Naevi, die bereits bei Geburt vorhanden sind oder im Säuglingsalter entstehen, werden als congenitale melanozytäre Naevi bezeichnet. Nur bei 1% aller Neugeborenen lässt sich ein solcher Naevus finden. (Zayour et al. 2011)

Als Pseudomelanome oder Melanomimitatoren sind Naevi definiert, die klinisch und/oder histologisch einem Malignen Melanom gleichen. Hierzu zählt vor allem der Spitz Naevus. (Hauschild et al. 2011)

Die Entstehung melanozytärer Naevi findet vorwiegend in der Kindheit und Jugend statt. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Anzahl der entstehenden Naevi. Zum einen lässt eine starke Assoziation zwischen der Entwicklung kindlicher Naevi und der Anzahl melanozytärer Naevi der Eltern auf eine genetische Komponente schließen. (Wiecker et al. 2003) Beeinflussender Umweltfaktor ist vorrangig UV-Strahlung. Nicht nur Sonnenbrände sondern auch moderate UV-Strahlung fördern die Entstehung melanozytärer Naevi. (Bauer et al. 2003) Des Weiteren zeigen junge Frauen eine durchschnittlich höhere Anzahl an Naevi. (English et al. 1988)

Das Risiko an einem Malignen Melanom zu erkranken, steigt fast linear mit der Anzahl erworbener melanozytärer Naevi, was diese somit zum wichtigsten Risikofaktor macht. (Bauer et al. 2003) Bei Patienten mit über 100 melanozytären Naevi erhöht sich das Risiko auf ein 8-10 faches ein Malignes Melanom zu entwickeln. (Hauschild et al. 2011) Vorallem congenitale melanozytäre Naevi weisen ein erhöhtes Melanomrisiko im Kindes- und Jugendalter auf. (Krengel et al. 2006)

1.2 Das Maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein von den Melanozyten der Haut ausgehender, maligner Tumor. Es hat unter den Tumoren der Haut die höchste Metastasierungsrate und ist die Ursache für mehr als 90% aller Sterbefälle an Hauttumoren. Im Jahr 2015 starben in Deutschland ca. 3.000 Menschen an den Folgen des malignen Melanoms. (GEKID Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V., 2011)

Im letzten Jahrzehnt wurde eine jährliche Steigerung der Inzidenz von 6,1% bei Männern und von 3,8% bei Frauen verzeichnet. Dies macht das maligne Melanom zur Krebsart mit dem stärksten Inzidenzanstieg; epitheliale Hauttumore ausgenommen. (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe, 2016)

Im Jahre 2012 machte das maligne Melanom in Deutschland einen Anteil von 4,6% bei Frauen und 4,1% bei Männern an allen Krebsneuerkrankungen aus. Es ist somit die 5. häufigste Krebsneuerkrankung in Deutschland. (Robert Koch Institut, 2015)

Obwohl auch ein Anstieg der Mortalitätsraten verzeichnet wird, fällt dieser deutlich geringer aus. Es ist also anzunehmen, dass trotz der rapiden Steigerung der Inzidenzraten, eine relative Stabilisierung der Mortalitätsraten eingetreten ist.

UV-Strahlung ist der wichtigste ätiologische Faktor der Melanomentstehung. Folgende Zusammenhänge sind besonders hervorzuheben: hellhäutige Menschen mit Hauttyp 1 bzw. 2 weisen eine höhere Inzidenzrate gegenüber Hauttyp 3 und 4 auf. Intermittierende Exposition hoher UV-Strahlung, wie sie in Sonnenurlaubeen regelhaft erlebt wird, erhöht das Melanomrisiko signifikant. Des Weiteren ist vor allem eine gesteigerte Sonnenexposition in der Kindheit und Jugend mit einem erhöhten Melanomrisiko assoziiert. Auch Menschen mit multiplen melanozytären Naevi, atypischem Naevussyndrom oder mehr als fünf atypischen melanozytären Naevi, zusätzlich zu familiärer Belastung, sind besonders gefährdet. (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe, 2016)

Klinisch-histologisch lässt sich das maligne Melanom nach der WHO-Klassifikation in verschiedene Subtypen unterteilen. Das superfiziell spreitende Melanom macht den prozentual größten Anteil mit 50-70% aller Melanome aus und tritt häufig an Rücken, Brust oder Extremitäten auf. Das noduläre Melanom, mit einem Anteil von ca. 20%, verfügt über schnelles vertikales Wachstum, sodass es zu den aggressiveren Subtypen des Melanoms zählt. Aus einer Lentigo Maligna, einem Melanoma in situ, kann vor allem auf lichtexponierten Hautarealen, wie dem Gesicht, ein Lentigo-maligna Melanom entstehen. Das akral-lentiginöse Melanom tritt bevorzugt bei dunkelhäutigen und asiatischen Menschen auf und entsteht häufig auf Schleimhäuten, Hand- und Fußinnenflächen sowie Phalangen. Weitere Formen sind das Amelanotische- und das Uvea-Melanom. (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe, 2016)

Die wichtigsten prognostischen Faktoren bei Patienten mit lokalisiertem kutanem Melanom sind Tumordicke, Mitoserate und Ulzeration. Diese drei Kriterien sind Teil der AJCC Klassifikation von 2009, welche das maligne Melanom in 4 Stadien einteilt. Stadien 3 und 4 weisen zusätzlich Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen auf. (Balch et al., 2009a) In der seit 01.01.2018 gültigen achten Auflage der AJCC Klassifikation entfällt die Mitoserate als Staging-Kriterium, ist aber weiterhin als wichtiger prognostischer Faktor anerkannt. (Gershenwald et al. 2017)

Das maligne Melanom metastasiert lymphogen, sodass ab einer Tumordicke von mehr als 1mm eine Wächterlymphknotenbiopsie empfohlen wird. Ein Drittel der Patienten mit metastasiertem Melanom weisen jedoch einen negativen Sentinel-Node Befund auf. (Carlson et al. 2003; Zbytek et al. 2008)

Die Primärexzision einer verdächtigen Läsion dient der Diagnostik sowie der gleichzeitigen Therapie. Falls zu diesem Zeitpunkt jedoch eine Metastasierung bereits stattgefunden hat, sind effektive Therapieoptionen limitiert. Dies betont die hohe Relevanz der Früherkennung, für die im Jahre 2008 in Deutschland ein Screening (ab dem 35. Lebensjahr, alle zwei Jahre) als Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses (GBA) eingeführt wurde.

Die Mikroumgebung eines Tumors wird von der Interaktion zwischen Tumor und Zellen der Umgebung, vor allem Immunzellen, geprägt. Eine tumorbedingte Inflammation des umliegenden Gewebes, welche durch eine vermehrte Anzahl an Leukozyten sowie Zytokinen und Chemokinen im Tumorbett charakterisiert ist, ist typisch. Dies bringt Gewebe-remodeling und Angiogenese mit sich, wodurch Tumorwachstum, Tumordinvasion und Metastasenbildung gefördert werden. Mit diesen Vorgängen assoziierte Immunzellen im malignen Melanom sind Makrophagen, Mastzellen und neutrophile Granulozyten. Zu Immunzellen mit Assoziation zu einer verbesserten Prognose werden aktivierte T-Zellen, B-Lymphozyten sowie dendritische Zellen gezählt. Obwohl folglich Immunzellinfiltrate unterschiedliche Auswirkungen auf die Prognose haben können, ist eindeutig, dass eine effektive Antitumor-Immunantwort die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs sowie der Metastasenbildung senkt. (Ladányi et al. 2015)

1.3 Immunzell-Infiltration des Tumors

Die standardisierte Einteilung des Tumorstadiums nach TNM-Klassifikation wird durch viele Experten als unzureichend eingestuft. Patienten, die bei gleicher Tumorentität demselben TNM-Stadium zugeteilt wurden, erfuhren häufig sehr unterschiedliche Erkrankungsverläufe. Die heute gültige TNM-Klassifikation (AJCC achte Auflage) lässt keine Aussagen auf das Ansprechen einer Therapie und lediglich eine limitierte prognostische Einschätzung zu. Auf der Suche nach einer Überwindung jener Mängel, lenkte sich der Focus der Forschung auf Immunzellinfiltrate der Tumormikroumgebung. Die Quantifizierung von Immunzellen enthüllte eine fortwiegend positive Auswirkung von zytotoxischen T-Zellen sowie T-Gedächtniszellen in Tumoren auf das Patientenüberleben. Diese Erkenntnis legte die Grundlage für das Konzept der Immune Contexture und des Immunoscore. (Galon et al. 2006)

Die Immune Contexture ist definiert als Typ, Dichte, Lokalisation und Funktion von Immunzellen des adaptiven Immunsystems in bestimmten Tumorebenen. Auf dessen Grundlage und anhand des kolorektalen Karzinoms als Modelltumor konnte der Immunoscore entwickelt werden. Der Immunoscore basiert auf der Auszählung zweier Lymphozyten Populationen, CD3/CD45RO oder CD3/CD8 oder CD8/CD45RO, und deren Lokalisation in entweder Tumorzentrum sowie marginaler Randzone. Je nach Konzentration der beiden ausgezählten Zellpopulationen in den zwei genannten Regionen, erfolgt eine Einteilung in das Scoring System, welches fünf Gruppen von I0 bis I4 beinhaltet. Diese Unterteilung unterscheidet sich von den Stadien der TNM-Klassifikation korreliert jedoch mit ihr. Beispielsweise wurde bei Patienten mit hoher Konzentration von CD8+ Lymphozyten (I3 oder I4) ein geringes T-Stadium festgestellt. Außerdem konnte eine erniedrigte Anzahl von CD8+ T-Zellen bei Patienten, die ein Rezidiv erlitten, gefunden werden. Das Ziel ist nicht die TNM-Klassifikation durch das Immunoscore-System zu ersetzen, sondern lediglich die TNM Einteilung auf eine TMN-I Klassifikation zu erweitern. (Angell et al. 2013; Galon et al. 2014)

Ein direkter Transfer auf das maligne Melanom und ein Nachweis der Bedeutung des Immunoscores, auch bei dieser Erkrankung, ist bereits in mehreren Studien erfolgt. Eine dieser Studien untersuchte kürzlich die Effektivität des Immunoscores bei Gehirnmetastasen verschiedener Tumorentitäten. Es wurden tumor-infiltrierende Lymphozyten analysiert und die Patienten in das Immunoscore-System eingeteilt. Der Immunoscore zeigte signifikante Korrelation mit der Überlebensprognose. Der prognostische Wert des Immunoscores unterschied sich von bereits etablierten prognostischen Parametern. (Berghoff et al. 2016)

Lymphozyten sind eine heterogene Gruppe von Zellen. Spezifischen Untergruppen dieser Zellrubrik werden verschiedene prognostische Eigenschaften zugeordnet. Hauptsächlich CD8+ T-Lymphozyten, Th1-Zellen und natürliche Killerzellen konstituieren als positiver prognostischer Faktor für verschiedene Tumorentitäten. Andere Lymphozytengruppen, wie beispielsweise Th2 CD4+ T-Zellen und CD4+CD25+FOXP3+ T-Zellen, sind häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert worden. (Senovilla et al. 2012)

T-Lymphozyten sind Zellen des adaptiven Immunsystems und vermitteln Entzündung. Sie sind eine funktionell heterogene Gruppe von Zellen, die alle einen T-Zell-Rezeptor tragen durch welchen von einem MHC Komplex präsentierte Peptide erkannt werden. Eine grobe Unterteilung in zytotoxische T-Lymphozyten, die das Molekül CD8+ auf ihrer Oberfläche tragen, und in T-Helfer-Zellen, die CD4+ exprimieren, kann getroffen werden. (Biedermann et al. 2016)

Die potenteste Zelle des menschlichen Immunsystems mit apoptotischen Fähigkeiten ist die den Zelloberflächenmarker CD8 exprimierende zytotoxische T-Zelle, die T-Effektorzelle. körpereigene Zellen, Gewebeverbände und spezifische Organe verfügen über teils spezifische Schutzmechanismen, um diese Zellen abzuschirmen. Da Tumore aus körpereigenen Zellen entstehen, verfügen auch sie zumeist über jenen Schutz und werden in ihrer frühen Entwicklungsphase meist vom Immunsystem toleriert. Zusätzlich zum anfänglichen zellulären Schutz der Tumorzellen schützen regulatorische T-Zellen sie zusätzlich durch die Fähigkeit zytotoxische T-Zellen, die körpereigene Strukturen zerstören, zu inhibieren. Dies dient vorsätzlich dem Schutz vor Autoimmunerkrankungen und der Steuerung der immunen Homöostase, jedoch kann dieser Mechanismus das Tumorwachstum unerwünschter Weise unterstützen. (Karimi et al. 2015; Klabusay et al. 2015) Eine Infiltration des Tumors mit regulatorischen T-Zellen korreliert folgerichtig auch mit einer schlechteren Prognose. (Joshi et al. 2015)

Die zytotoxischen T-Zellen des menschlichen Körpers sind in der Lage Tumor-Antigene zu erkennen und die transformierten Zellen zu töten. Dies macht das Immunsystem zur wichtigsten Komponente der natürlichen Tumorabwehr und die zytotoxischen Lymphozyten zum Gegenspieler der regulatorischen T-Zelle. Tumorzellen verfügen teilweise über die Funktion die Immunantwort durch Signalstoffe der Zelle oder der Mikroumgebung abzuschwächen. Es ist also von Bedeutung die Reaktion der zytotoxischen T-Zellen zu verstärken, um dadurch effektiv die Tumorimmunabwehr zu unterstützen. (Reiser et al. 2016)

Bereits etabliert ist die prognostische und prädiktive Kraft von Tumor infiltrierenden Lymphozyten (TIL) in triple-negativem Brustkrebs (Salgado et al., 2015) sowie in kolorektalem Karzinom. Zu den Tumor infiltrierenden Lymphozyten (TIL) zählen CD3 exprimierende T-Zellen, die insbesondere CD4 positive T-Helferzellen und CD8 positive T-Effektorzellen darstellen. Beim kolorektalen Karzinom ließ die Analyse der Immunzellinfiltrate des Tumors zusätzlich eine Vorhersage auf die Ansprechrate der Chemotherapie mit einer Sensitivität von 79% und einer Spezifität von 100% zu. Die

Assoziation von einer hohen Immunzellkonzentration mit verlängertem progressionsfreiem Überleben war signifikant. (Halama et al. 2011) Zusätzlich ist die Hypothese aufgestellt worden, dass T-Lymphozyten die Metastasenbildung bei kolorektalem Karzinom regulieren. (Betts et al. 2012) Allgemein ergaben Analysen, dass CD3+ und CD8+ tumor-infiltrierende Lymphozyten einen positiven Effekt auf die Überlebenszeit haben. (Gooden et al. 2011)

Die Studienlage bezüglich tumor-infiltrierender Lymphozyten im malignen Melanom zeigt sich widersprüchlich. 2005 wurde in einer Studie demonstriert, dass die Konzentration von zytotoxischen Lymphozyten im Melanom mit einer verbesserten Prognose assoziiert ist. (Piras et al. 2005) Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch die Präsenz von CD4+ Lymphozyten zu einer verbesserten Immunabwehr des Tumors führt. (Van Houdt et al. 2008)

Eine weitere Analyse ergab, dass die Konzentration von tumor-infiltrierenden Lymphozyten unabhängig von weiteren prognostischen Parametern des Melanoms, mit einem verringerten Risiko verbunden ist, an der Erkrankung zu sterben. (Thomas et al. 2013)

In einer Studie mit einer größeren Patientenkohorte (n=186) konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Konzentration von CD8+ Lymphozyten und einer verbesserten Prognose gezeigt werden. Hier wurde jedoch gezeigt, dass intratumorale neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen mit einer verschlechterten Prognose einhergehen. (Jensen et al. 2012) Eine mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Größe der Patientenkohorte sowie verschiedene Methodiken der Studien sein. (Ladányi et al. 2015)

Ulzerierte Melanome zeigen eine einzigartige Tumor Mikroumgebung und weisen eine signifikant schlechtere Prognose auf. Die Infiltration von TIL in ulzerierten Melanomen korreliert mit einer verlängerten Überlebenszeit sowie längerem rezidivfreiem Überleben. Dieser Zusammenhang konnte jedoch bei nicht ulzerierten Melanomen nicht festgestellt werden. (de Moll et al. 2015)

Die Immuntherapie von Tumoren hat sich in den letzten Jahren weiterentwickelt. Neue Therapien wie der Zell Transfer von TIL scheinen vielversprechend. Dem Patienten entnommene und aufgearbeitete Lymphozyten konnten durch Retransfer eine Ansprechrate von ca. 50% erzielen und die Tumor Regression in 49-72% der Patienten beeinflussen. Bei Melanom Patienten, die zuvor andere Immuntherapien (Immun-Checkpointinhibitoren, Zytokintherapie) durchliefen, schaffte der TIL Transfer einen signifikanten Überlebensvorteil. Es ist noch nicht bekannt, welche Prädiktoren für das Ansprechen der TIL Therapie existieren. Voraussetzungen für eine solche Behandlung sind jedoch ein resektabler Tumor, ein Tumor aus dem TIL generiert werden kann und eine Tumor spezifische Reaktivität jener Zellen. (Goff et al. 2010; Zikich et al. 2016)

1.4 Der eosinophile Granulozyt

Eine weitere Leukozytenpopulation, die erst kürzlich mit einer bedeutenden Rolle in der Tumormimmunabwehr assoziiert wurde, sind die eosinophilen Granulozyten. In diversen Studien wurde demonstriert, dass eine erhöhte Anzahl von eosinophilen Granulozyten im Tumorgewebe mit einer deutlich verbesserten Prognose einhergeht. (Davis and Rothenberg, 2014; Lotfi et al. 2007)

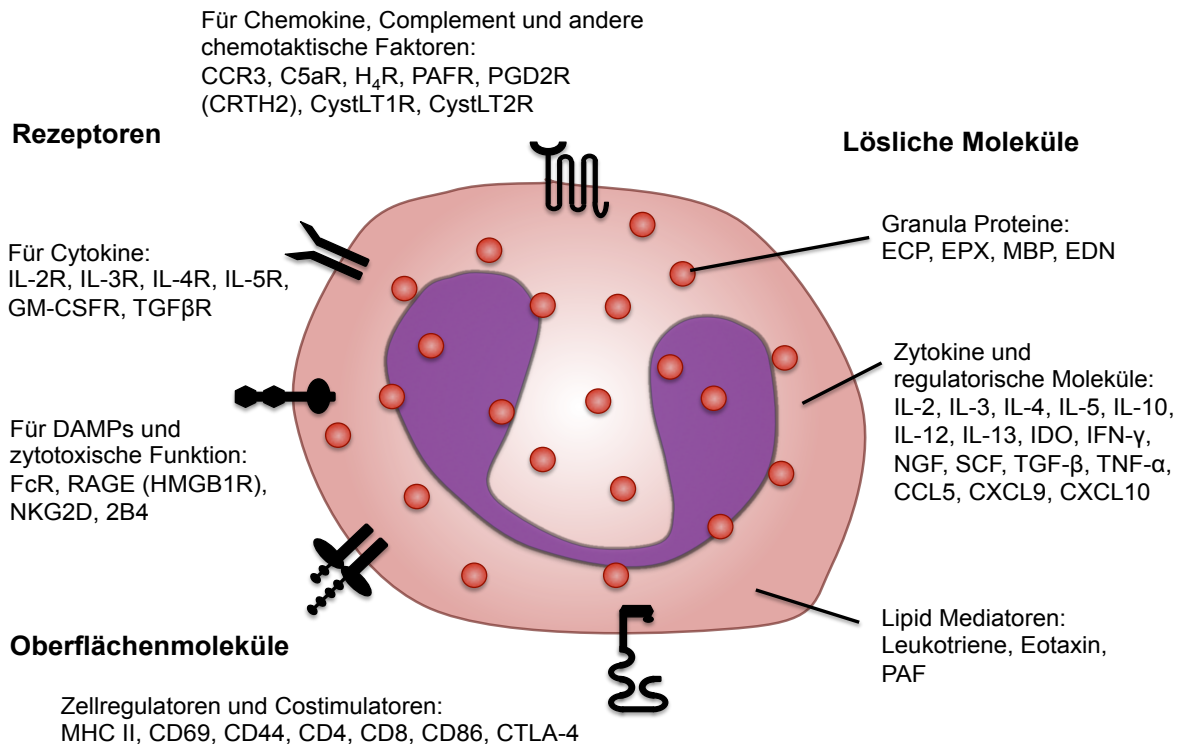


Abbildung 1 Eosinophiler Granulozyt (eigene Darstellung nach Davis & Rothenberg, 2014)

Der Eosinophile Granulozyt wurde zum ersten Mal 1879 von Paul Ehrlich unter einem Lichtmikroskop anhand des Farbstoffs Eosin sichtbar gemacht. Das Eosin färbte die zahlreichen Granula der Granulozyten an und verlieh ihnen so ihren Namen. (Kay, et al. 2015)

Eosinophile Granulozyten entstammen der myeloischen Zellreihe und für ihre Reifung sind Faktoren wie Interleukin 5 und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) essentiell. (Metcalf et al. 1986)

Sie machen im gesunden Menschen einen Anteil von 1-5% an den gesamten Leukozyten aus. Histologisch zeigen sie einen Durchmesser von 8 µm, einen zweilappigen Zellkern und Granulation im Zytoplasma. (Radonjic-Hoesli et al. 2016) Folgende vier Proteine sind in den Granula enthalten: Major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophile Peroxidase (EPX) und eosinophil-derived neurotoxin (EDN). (Giembycz et al. 1999; Shi et al. 2004)

Eine erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten im Blut zeigt sich bei allergischen Erkrankungen, insbesondere bei Asthma bronchiale. Außerdem nehmen Eosinophile eine wichtige Position in der parasitären Immunabwehr ein. (Radonjic-Hoesli et al. 2016) Sie sind in der Lage Parasiten zu eliminieren indem sie Granula mit potenten Oxidantien sowie kationische Proteine freisetzen. Dies begünstigt Inflammation im Gewebe, sodass dieser Vorgang nicht nur bei Asthma bronchiale, sondern auch bei Haut- und Herzkrankheiten eine Rolle spielt. (Gleich et al. 1986)

Das Verständnis von eosinophilen Granulozyten hat sich von der alleinigen Funktion als destruktive Effektorzelle auf eine aktive Beteiligung an Immunmodulation, Gewebereparaturmechanismen und Organentwicklung erweitert. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass unterschiedlichste Zytokine, Chemokine, Lipidmediatoren und Wachstumsfaktoren in ihren Granula gespeichert sind und sie die Fähigkeit der selektiven Sezernierung jener Granula besitzen (Melo et al. 2013). Eosinophile Granulozyten können Immunglobulin E binden und setzen bei Kontakt mit Anti-IgE-Komplexen immunmodulatorische Mediatoren frei, die zu einer Inflammation des Gewebes beitragen. (Gleich et al. 1986) Es wird angenommen, dass je nach Zytokinexpression und damit einhergehenden funktionellen Unterschieden, verschiedene Subpopulationen von eosinophilen Granulozyten bestehen. (Roth et al. 2011)

Das Immunsystem des Menschen verfügt über zwei verschiedene Mechanismen bezüglich der Tumorprogression. Zum einen ist es in der Lage sich entwickelnde Tumorzellen zu zerstören. Zum anderen kann es das Wachstum von Tumorzellen und deren Metastasierung fördern. (Gutkin et al. 2014)

Infiltration von eosinophilen Granulozyten wurde in mehreren Tumorentitäten beschrieben und scheint unabhängig von anderen Risikofaktoren, wie Alter, Geschlecht, Staging und histologischem Grading, mit einer verbesserten Prognose und längerem Überleben assoziiert zu sein. Eosinophile lassen sich vor allem in nekrotischen Arealen des Tumorgewebes finden. (Davis and Rothenberg, 2014) Studien konnten zeigen, dass eosinophile Granulozyten durch die von Tumorzellen sekretierten chemotaktischen Faktoren, wie Eotaxin und HMGB1, angelockt werden. (Lotfi et al. 2009; Simson et al. 2007)

Die Degranulation der Granulozyten ist auf nekrotische Areale beschränkt, sodass von einem spezifischen Signalmechanismus der nekrotischen Zellen für Eosinophile auszugehen ist. Elektronenmikroskopisch konnte dargestellt werden, dass aktivierte eosinophile Granulozyten degranulieren, nachdem sie in Kontakt mit Tumorzellen standen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Antitumorantwort von Eosinophilen vor allem durch Degranulation vonstatten geht. (Caruso et al. 2011; Cormier et al. 2006) Die vier, in den eosinophilen Granula enthaltenen, kationischen Proteine namens ECP, EPX, MBP und EDN scheinen für Dysfunktion und Zerstörung der umliegenden Tumorzellen verantwortlich zu sein. (Shi et al. 2004)

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Antitumorantwort von Eosinophilen Granulozyten besteht in ihrer Assoziation zu T-Zellen im Tumorbett. In Vitro Experimente konnten zeigen, dass Eosinophile Antigene verarbeiten und auf ihrer Oberfläche präsentieren können. Nach Induktion durch Zytokine agieren sie somit als Antigen-präsentierende Zellen und können T-Lymphozyten stimulieren. (Shi et al. 2004)

Aktivierte Eosinophile Granulozyten setzen außerdem eine Mehrzahl verschiedener Chemokine frei, die CD8+ T-Zellen anlocken. Es konnte gezeigt werden, dass Eosinophile für die Antitumorreaktion der T-Zellen essentiell sind. In einem Mausmodell mit Malignem Melanom wurden T-Lymphozyten zusammen mit eosinophilen Granulozyten übertragen und führten so zu einer viel effektiveren Inhibition des Tumorstwachstums, als bei demselben Versuch mit der alleinigen

Übertragung von T-Zellen. Dieses zu beobachtende Phänomen beruht auf der Tatsache, dass aktivierte Eosinophile Chemokine sezernieren, wie CCL5, CXCL9 und CXCL10, die CD8⁺ T-Zellen in den Tumor locken. (Carretero et al. 2015)

Des Weiteren wurde festgestellt, dass durch Co-Transfer von Eosinophilen und T-Zellen in einen Tumor die Tumor Mikroumgebung verändert wird. Als markanteste Veränderungen waren hier die Normalisierung der Tumor Vaskularisation sowie die Makrophagen Polarisierung zu beobachten. Blutgefäße eines Tumors zeigen sich mit vielen Unregelmäßigkeiten und struktureller Abnormität, was auf das schnelle, durch VEGF induzierte Wachstum zurückzuführen ist. Eine normalisierte Struktur der Blutgefäße erleichtert T-Zellen die Infiltration in das Tumorbett und trägt somit zur Tumorabwehr bei.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Eosinophile die M2 Polarisierung von Makrophagen verhindern, sodass sich mehr M1 polarisierte Makrophagen im Tumorgewebe befinden, wodurch die Tumorabwehr wiederum unterstützt wird. (Carretero et al. 2015)

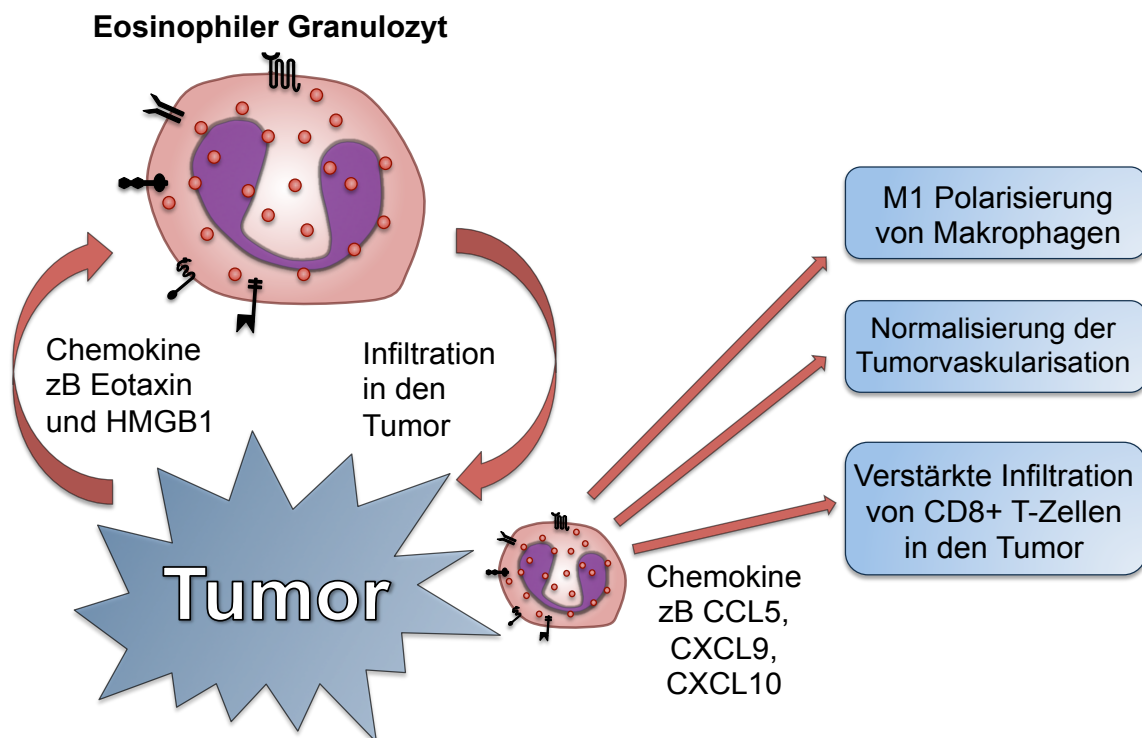


Abbildung 2 Antitumoraler Effekt von Eosinophilen (eigene Darstellung nach Carretero et al., 2015)

Wie eosinophile Granulozyten zählen auch Makrophagen zu den Zellen des Immunsystems und entstammen ebenfalls der myeloischen Zellreihe. Die Polarisierung von Makrophagen erlaubt divergente Funktionen in der Tumor Mikroumgebung; eine Polarisierung wird auch für eosinophile Granulozyten vermutet. Makrophagen lassen sich in allen Geweben des Körpers finden, wo sie zumeist zur Immunabwehr von Infektionen durch Phagozytose beitragen. Zusätzlich sind Makrophagen bei der Homöostase, bei Gewebereparaturmechanismen und Gewebeaufbau eine wichtige Komponente. (Liu et al. 2015)

Auch Makrophagen akkumulieren wie andere Immunzellen im Tumorbett und haben Auswirkungen auf die Tumor Mikroumgebung. Sogenannte tumor-associated Makrophagen, TAMs, unterscheiden sich phänotypisch von normalen Makrophagen des Gewebes. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass TAMs eines Mammakarzinoms andere Adhäsionsmoleküle exprimieren als reguläre Makrophagen des Brustgewebes. (Franklin et al. 2014)

TAMs stellen jedoch keine homogene Gruppe von Zellen dar. Sie können durch eine klassische oder eine alternative Aktivierung in unterschiedliche Funktionszustände gebracht werden, die sich bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Tumor Mikroumgebung deutlich voneinander unterscheiden. Eine sogenannte klassische Aktivierung von TAMs kann durch bakterielle Infektionen, Interferon 1 oder 2 hervorgerufen werden und führt zu einer M1 Polarisierung jener Makrophagen. Gegenteilig fördern M-CSF, IL-4 und IL-13 die alternative Aktivierung zu einer M2 Polarisierung. Beide Funktionszustände stellen kein Ultimatum dar, sodass ein Makrophage nicht immer eindeutig einer der beiden Polarisierungen zugeordnet werden kann. Es befindet sich ein Kontinuum von Aktivierungszuständen zwischen beiden Polarisierungen. M1-Makrophagen können das Tumorstadium hemmen und Th1 Leukozyten sowie Effektorzellen in das Tumorgewebe rekrutieren. Alternativ aktivierte M2-Makrophagen fördern hingegen das Tumorstadium durch Unterstützung der Tumorstadiumgenese und des Gewebeumbaus. (Fujimura et al. 2016; Galdiero et al. 2013; Oršolić et al. 2016)

M1 Makrophagen exprimieren eine hohe Konzentration von IL-12 und IL-23 sowie wenig IL-10. Sie sind außerdem in der Lage verschiedene inflammatorische Cytokine, wie IL-1b, IL-6 und TNF sowie reaktiven Sauerstoff zu sezernieren.

M2 Makrophagen wiederum produzieren eine niedrige Konzentration von IL-12 und 23, allerdings eine hohe Konzentration von IL-10. Sie fördern außerdem Inflammation und die Th2 Immunantwort. (Fujimura et al. 2016)

Je nach Signalen der Mikroumgebung des Tumors können TAMs zwischen ihrer M1 und M2 Polarisierung wechseln. In der Forschung nach neuen Krebstherapien könnte dies einen möglichen Therapieansatzpunkt darstellen. (Huang et al. 2016)

Auch für die Therapie des Malignen Melanoms sind dies relevante Ansätze. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von ROS eine relevante Rolle in der Invasion und Aktivierung von TAMs in Malignem Melanom spielen. (Lin et al. 2013)

Außerdem wurde die Expression von Adrenomedullin in Tumoren des Malignen Melanoms beschrieben und als Ursprungszellen konnten TAMs identifiziert werden. Adrenomedullin fördert Angiogenese und Wachstum der Melanomzellen durch parakrine Effekte sowie die M2 Polarisierung der Makrophagen. (Chen et al. 2011)

Viele klinische Daten deuten auf eine Verschlechterung der Prognose bei hohen Konzentrationen von TAMs hin. (Estko et al. 2015; Jinushi et al. 2015; Liu et al. 2015)

Tabelle 1: Zeitstrahl des Forschungsfortschritts zu eosinophilen Granulozyten anhand ausgewählter Publikationen

Jahr	Erkenntnis	Publikation
1981	Tumor-associated tissue eosinophilia (TATE) und tumor-associated blood eosinophilia (TABE)	(Lowe et al., 1981)
1987	Eosinophile als Zellen der allergischen Inflammation	(Venge et al., 1987)
1990	Stärke einer Asthma Erkrankung korreliert mit der eosinophilen Inflammation der Atemwege	(Bousquet et al., 1990)
1994	Eosinophile als Marker für Abstoßung von Lebertransplantaten	(de Groen et al., 1994)
1995	Eosinophile bei Asthma in der Kindheit, ECP Konzentrationen korrelieren mit Schweregrad	(Koller et al., 1995) (Krouwels et al., 1995)
1995	Eosinophile modulieren die Expression von Interleukin 4 in chronisch entzündlicher Mukosa	(Nonaka et al., 1995)
2004	Eosinophile spielen eine entscheidende Rolle in dem Vorgang des Airway-remodelling	(Humbles et al., 2004)
2005	Aktivierte Eosinophile in der Remissionsphase von Colitis ulcerosa	(Lampinen et al., 2005)
2007	Eosinophile als Effektorzellen der Tumor Immunantwort	(Simson et al., 2007a)
2008	Eosinophile Granulozyten zeigen Interaktionen mit peripheren Nervenzellen	(Raap and Wardlaw, 2008)
2009	Antitumor Antwort von Eosinophilen durch oxidativen Abbau von nekrotischem Material	(Lotfi et al., 2009b)
2010	Montelukast reduziert die eosinophile Inflammation bei Erkrankungen der oberen Atemwege	(Mullol et al., 2010)
2014	Natürliche Killerzellen können die Degranulation und Apoptose von Eosinophilen induzieren	(Awad et al., 2014)
2015	Eosinophile im Tumorbett locken T-Zellen durch Sezernierung von Chemokinen an	(Carretero et al., 2015)

1.5 Lymphozytäre und eosinophile, immunhistochemische Marker

1.5.1 CD8

CD8 ist ein Oberflächenprotein, das in der Zellmembran von T-Zellen charakteristisch ist und diese in ihrer immunologischen Funktion klassifiziert. CD bedeutet ‚Cluster of Differentiation‘ und beschreibt somit die immunologische Zuordnung, die es der tragenden Zelle gibt. Das CD8 Protein ist ein spezifischer T-Zell Rezeptor, der als Dimer aus zwei verschiedenen Ketten (α - β -Heterodimer) besteht, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und je eine immunoglobulinartige Domäne enthalten. (Murphy et al. 2009)

T-Lymphozyten sind eine heterogene Gruppe von Zellen bezüglich ihrer verschiedenen Funktionen. Vorhandenes CD8 auf seiner Oberfläche klassifiziert einen T-Lymphozyt als zytotoxische T-Zelle. Weiterhin kann ein T-Lymphozyt mit dem CD8 Rezeptor auch als T-Gedächtniszelle oder als regulatorische T-Zelle agieren. Außerdem wird CD8 auf der Oberfläche von NK-Zellen, Thymozyten, dendritischen Zellen und Zellen eines lymphoblastischen T-Zell-Lymphoms gefunden. (Leong et al. 2003)

Funktionell gilt CD8 als Korezeptor, da es an MHC-I-Komplexe auf antigenpräsentierenden Zellen bindet und die zytotoxische T-Zelle durch diesen Mechanismus aktiviert wird. MHC-1 wird von allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert und ermöglicht jenen Zellen kurze Peptide auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Bei diesen Peptiden handelt es sich zumeist um virale Peptide oder Peptide durch Krebszellen mutierter Proteine. Die Bindung des CD8-Rezeptors an einen MHC-1-Komplex signalisiert der zytotoxischen T-Zelle, dass eine Funktionsstörung der Zelle vorliegt und diese zerstört werden muss. Die zytotoxische T-Zelle ist nun in der Lage die infizierte Zelle abzutöten. (Murphy et al. 2009; Paul et al. 2013)

CD8 T-Zellen sind, durch das Erkennen von Tumorantigenen und Abtöten transformierter Zellen, Führer der Antitumor Immunantwort. Eosinophile Granulozyten, die sich im Tumorgewebe befinden, setzen Chemokine frei, die T-Zellen in das Tumorbett locken. Die Interaktion beider Zellgruppen ist entscheidend für eine effektive Wachstumsinhibition. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Übertragung von CD8 T-Zellen zusammen mit aktivierten Eosinophilen zu einer sehr viel effektiveren Inhibition des Tumorwachstums führte als bei alleiniger Übertragung von T-Zellen. (Carretero et al. 2015; Reiser et al. 2016)

Durch die Erkenntnis der Bedeutung von CD8 T-Zellen in der Tumorabwehr entwickelten sich neue Ansätze für wirksame Immuntherapien. Eine neue immuntherapeutische Strategie ist der adoptive Zelltransfer (ACT) mittels Tumorantigenspezifischer CD8 T-Zellen. Trotz einiger Erfolge dieser Therapie im Mausmodell sowie am Menschen konnte gezeigt werden, dass auf initiale Tumorregression häufig ein unkontrolliertes Rezidiv folgt. Mögliche Erklärungen suggerieren, dass die inkomplette Elimination des Tumors durch T-Zellen den Tumorzellen die Fähigkeit verleiht, sich bei einem Rezidiv der Tumorkontrolle durch T-Zellen zu entziehen. (Contreras et al. 2016; Kaluza et al. 2012; Straetmans et al. 2015)

Die weitere Observation des Verhaltens von CD8 T-Zellen bezüglich Tumorummunabwehr und der Interaktion mit eosinophilen Granulozyten ist entscheidend für weitere Therapieansätze bei Malignem Melanom.

1.5.2 CD69

CD69 ist ein Oberflächenprotein, das zur Familie der Typ 2 integralen Transmembranproteinen gehört. Es besitzt C-Typ Lectin Domänen und Disulfidbrücken, die es zu einem Homodimer verbinden. CD69 weist eine biochemische Ähnlichkeit mit Asialoglycoprotein Rezeptoren, wie dem low-affinity IgE Rezeptor (CD23) oder NKR-P1 auf natürlichen Killerzellen, auf.

CD69 kann auf der Oberfläche von hämatopoetischen Zellen, wie T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen, Thrombozyten sowie eosinophilen Granulozyten gefunden werden. (Ziegler et al. 1993)

Bei der Aktivierung von Leukozyten ist CD69 eines der ersten Oberflächenproteine, die exprimiert werden. Es konnte nur auf aktivierten und nicht auf ruhenden Lymphozyten gefunden werden. In vitro wurde gezeigt, dass CD69 die Produktion von Interleukin-2, TNF Alpha sowie die NO Sekretion von Monozyten induziert, was ein Hinweis auf die proinflammatorische Funktion dieses Rezeptors sein kann. (Sancho et al. 2005)

Auch Thrombozyten tragen CD69 auf ihrer Oberfläche, die durch Quervernetzung zur Aggregation und Mediatorfreisetzung der Thrombozyten führen. Die Expression von CD69 auf Eosinophilen wird durch GM-CSF, Interleukin-3 und -5 sowie Interferon- γ induziert. Folglich ist CD69 ein Marker der Eosinophilen Aktivierung durch Zytokine, wie sie beispielsweise in Asthma bronchiale vorkommen. (Foerster et al. 2002; Hartnell et al. 1993)

Die Relevanz von Eosinophilen in Bronchiallavage-Flüssigkeit bei Asthma bronchiale ist bereits seit vielen Jahren bekannt. In einer Studie konnte festgestellt werden, dass die CD69 Expression auf Eosinophilen bei Allergenprovokation über 18 Stunden signifikant anstieg und mit einer Konzentrationserhöhung von GM-CFS einherging. CD69 Expression geht folglich auch mit einer Aktivierung von Eosinophilen in asthmatischen Patienten einher. (Julius et al. 1999) Außerdem lässt eine weitere Studie darauf schließen, dass CD69 positive Eosinophile an der Pathogenese von Asthma bronchiale beteiligt sind. In einem Mausmodell wurde demonstriert, dass die Behandlung von Asthma mit Anti-CD69 Monoklonalenantikörpern genauso gute Ergebnisse erzielte, wie die gängige Therapie mit Dexamethason. (Wang et al. 2015)

Auch in anderen Erkrankungen, wie Protein-induzierte Enterokolitis (food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES)), wurde eine Verbindung zwischen eosinophiler Aktivierung und CD69 Expression gefunden. (Wada et al. 2016)

Ein Zusammenhang zwischen Tumoren und CD69 konnte immer wieder festgestellt werden. Zum einen wurde eine positive Korrelation zwischen der Expression von CD69 auf T-Zellen und höheren T Stadien in Plattenepithelkarzinomen des Larynx beschrieben. Aggressive und tief infiltrierende Plattenepithelkarzinome wiesen eine höhere durchschnittliche Konzentration von CD69 auf. (Starska et al. 2011) Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen CD69 Expression und schlechter Prognose in Chronisch Lymphatischer Leukämie gezeigt. (Poeta et al. 2012)

CD69 wird vorallem von T-Zellen bei Kontakt mit chronischer Inflammation gebildet. Jene CD69+ T-Zellen scheinen immunmodulatorische Eigenschaften zu besitzen. Tumor assoziierte Makrophagen sezernieren große Mengen von Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase (IDO) in Tumorzellnestern, wenn sie mit CD69+ T-Zellen in Kontakt kommen. IDO ist ein Protein, das immunmodulierende Eigenschaften besitzt und Tumorzellen ermöglicht der Antitumorantwort des Immunsystems zu entgehen. (Uyttenhove et al. 2003; Zhao et al. 2012)

In Kontrast dazu, konnte in einem Mausmodell mit Kolonkarzinom gezeigt werden, dass CD8⁺ CD69⁺ T-Zellen das Tumorstadium erfolgreich inhibieren, indem sie Apoptose der Tumorzellen induzieren. (Lan et al. 2016)

CD69⁺ T-Zellen wurden ebenfalls in Malignem Melanom gefunden und korrelierten dort mit einem verlängerten Überleben. (Hillen et al. 2008; Murray et al. 2016)

In einer weiteren Studie wurden Dendritischen Zellen sowie T-Zellen einer Mikroumgebung von lebenden, nekrotischen und apoptotischen Brustkrebszellen ausgesetzt. In der Mikroumgebung der apoptotischen Krebszellen coexprimierten regulatorische T-Zellen die Oberflächenproteine CD39 und CD69. Es wurde daraus geschlossen, dass die Expression von CD69 auf CD39⁺ regulatorischen T-Zellen eine Interaktion mit CD8⁺ T-Effektorzellen ermöglicht und so die Zytotoxizität auf Tumorzellen inhibiert wird. (Sekar et al. 2012)

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass CD69 auf einer Reihe von hämatopoetischen Zellen vorkommt und jenen Zellen unterschiedliche Funktionen vermittelt. Eine eindeutige Assoziation zwischen der Expression von CD69 und der Aktivierung von eosinophilen Granulozyten konnte bereits gezeigt werden. (Matsumoto et al. 1998) Die Auswirkungen von CD69 im Tumorbett, insbesondere auf der Oberfläche von T-Zellen, scheinen widersprüchlich. Das weitere Erforschen von aktivierten Eosinophilen in ihrer Funktion als Antitumorzelle scheint essentiell um die Möglichkeiten neuer Antitumorthapien zu realisieren.

1.5.3 CD44

Das Protein CD44 ist ein transmembranes Glykoprotein der Zellmembran, das auch Hermes Antigen genannt wird. Es ist glykosyliert, phosphoryliert und besitzt eine Pyrrolidincarboxylsäure. CD44 fungiert als Rezeptor für Hyaluronsäure und kann somit Kontakte zwischen Zellen sowie zur extrazellulären Matrix herstellen. Des Weiteren ermöglicht das Protein die Bindung von Osteopontin, Kollagenen und Matrix-Metalloprotease. Es ist beteiligt an der Aktivierung von Lymphozyten, der Hämatopoese sowie der Zytokinese. (Aruffo et al. 1990) Die genomische Struktur von CD44 ist sehr komplex, da durch alternatives Spleißen funktionell distinkte Isoformen entstehen. Die Standardisoform CD44s unterscheidet sich beispielsweise von der Isoform CD44v. Strukturelle sowie funktionelle Unterschiede führen zu einer hohen Diversität des Proteins. (Screaton et al. 1992; Xu et al. 2015)

Alternativ gespleiste Formen von CD44 werden mit Tumorstadium und Metastasierung assoziiert. In Studien wurde gezeigt, dass eine hohe CD44 Expression in Tumorzellen die Tumorstadium, Metastasen- und Rezidivbildung sowie Chemotherapie Resistenz begünstigt. Die Interaktion von CD44 mit Hyaluronsäure verstärkt EGFR-modulierte Signalwege und vermittelt so eine Tumor unterstützende Umgebung. Entsprechend führt eine Blockade von CD44 zu einer Verminderung des malignen Phänotyps sowie zu einer Verlangsamung des Tumorstadiums und einer Therapiesensibilität. (Matsumura et al. 1992; Thapa et al. 2016; Xu et al. 2015) In einer Studie konnte gezeigt werden, dass in 49% aller primären Magenkarzinomen die Expression von CD44 gefunden wurde, welche wiederum mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit sowie Mortalität assoziiert war. (Mayer et al. 1993) Eine neue Erkenntnis in diesem Zusammenhang ergab die Assoziation von CD44 zum Tumorsuppressorprotein p53. Der Tumorsuppressor p53 inhibiert die Expression von CD44 auf der Zelloberfläche. Dies erlaubt der Zelle auf zytostatische oder apoptotische Signale des p53 Signalweges zu reagieren, die sonst von CD44 blockiert

werden. CD44 ist folglich im Stande die Apoptose einer entarteten Zelle zu verhindern und somit Tumorwachstum zu begünstigen. (Godar et al. 2008) Ein Zusammenhang zwischen CD44 Expression und Tumorwachstum konnte bereits für verschiedene Karzinome gezeigt werden. Dazu zählen beispielsweise das Mammakarzinom (Al-Hajj et al. 2003), das Prostatakarzinom (Collins et al. 2005) sowie das Pankreaskarzinom (Li et al. 2007).

Zusätzlich ist CD44 am Extremitätenwachstum beteiligt. Es wird in der apikalen ektodermalen Randleiste exprimiert und präsentiert sich als Wachstumsfaktor für Fibroblasten, sodass das Protein essentiell für erfolgreiche Entwicklung der Extremitäten ist. (Van Royen et al. 2004) Außerdem wird CD44 im Prozess der Arteriogenese benötigt. Die Expression von CD44 nimmt während der Arteriogenese stark zu und inhibiert diese bei verminderter Bildung. Patienten mit unzureichender Kollateralisation wiesen eine reduzierte Anzahl an CD44 exprimierenden Monozyten auf, im Vergleich zu Patienten mit guter Kollateralisation. (Aruffo et al. 1990; Harfi et al. 2013; Xu et al. 2015)

CD44 kann außerdem auch auf hämatopoetischen Zellen gefunden werden. Schon in frühen Stadien des hämatopoetischen Prozesses findet sich das Protein auf T und B-Lymphozyten. Auf reifen Lymphozyten wird die Expression von CD44 als Reaktion auf Antigenpräsentation gesteigert, sodass sich CD44 als Aktivationsmarker von T-Zellen klassifizieren lässt. (Lesley et al. 1993; Shim et al. 2015) Des Weiteren wurde festgestellt, dass eine hohe Expression von CD44 auf T-Zellen essentiell ist, um zu Th1-Gedächtniszellen reifen zu können. (Baaten et al. 2010)

Die Relevanz von CD44 auf eosinophilen Granulozyten wurde in Bezug auf Asthma erstbeschrieben. Der Oberflächenmarker wird auf ruhenden Eosinophilen exprimiert, jedoch steigt die Expression nach Aktivierung durch Zytokine deutlich an. Das Ausmaß der Expression von CD44 auf Eosinophilen kann als Aktivitätsmarker von Bronchialasthma herangezogen werden. (Sano et al. 1997) Generell wird CD44 wie auch CD69 als Aktivationsmarker von eosinophilen Granulozyten klassifiziert. Beide Oberflächenmarker wurden als zuverlässigste Parameter der Aktivierung von Eosinophilen eingestuft. (Bochner et al. 2000; Matsumoto et al. 1998; Yoshimura et al. 2002)

Des Weiteren wurde CD44 als Biomarker von Melanomzellen herangezogen. Da es jedoch als prognostisch zu ungenau eingestuft wurde, werden andere Marker bevorzugt. (Larson et al. 2009)

Ein weiterer Zusammenhang zwischen CD44 und Malignem Melanom konnte in einer Studie dargestellt werden. Es wurde festgestellt, dass die Gabe von IL-2 in Milzzellen die Expression von CD44 auf T-Zellen sowie Natürlichen Killerzellen steigert. Daraufhin wurden CD44 positive Mäuse mit Malignem Melanom mit IL-2 therapiert, wodurch eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums erreicht wurde. Die Relevanz von CD44 wurde überprüft und es konnte demonstriert werden, dass Lymphozyten mit einer hohen CD44 Expression für das Abtöten der Melanomzellen verantwortlich sind. (Sun et al. 2012)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CD44 eine zentrale Rolle in der Tumorforschung einnimmt. Es scheint je nach Ort der Expression unterschiedliche Auswirkungen auf Tumorwachstum und Metastasierung zu haben. CD44 wird auf hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist ein eindeutiger Aktivierungsmarker der eosinophilen Granulozyten.

1.5.4 ECP

Das eosinophile kationische Protein (engl. Eosinophil cationic protein – ECP) ist ein kleines Protein, das in der Matrix von eosinophilen Granulozyten lokalisiert ist und auch als Ribonuklease 3 (RNase 3) bezeichnet wird, da es zur Familie der Ribonukleasen gehört. Die Granula von eosinophilen Granulozyten enthalten neben ECP eosinophile Peroxidase (EPX), Major Basic Protein (MBP) und eosinophil-derived Neurotoxin (EDN). ECP wird während der Degranulation von Eosinophilen gemeinsam mit den anderen Proteinen aus den Granula freigesetzt und besitzt zytotoxische Aktivität, die sich gegen Bakterien, Parasiten und Viren richtet. Zusätzlich besitzt ECP Ribonuklease Aktivität, die sich unabhängig von den zytotoxischen Eigenschaften zeigt. (Hamann et al. 1990; Rosenberg et al. 1989; Simson et al. 2007; Venge and Byström, 1998)

Bereits in eosinophilen Vorläuferzellen im Knochenmark findet sich das Protein ECP. Nur Eosinophile scheinen in der Lage zu sein, dieses spezielle Protein zu bilden, obwohl auch in Neutrophilen Granulozyten ECP gefunden wurde. Es wird angenommen, dass Neutrophile ECP per Phagozytose aufnehmen können und es dann ebenfalls in ihren Granula speichern. (Byström et al. 2002; Venge et al. 1999)

Die Degranulation von eosinophilen Granulozyten kann auf zwei verschiedenen Wegen induziert werden. Zum einen kann dieser Mechanismus durch Antikörper in Form von Immunglobulinen ausgelöst werden, zum anderen wird es Antikörper unabhängig über das Komplementsystem vermittelt. Interleukin-5 und -3 sowie der Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) beeinflussen die Degranulation positiv. (Carlson et al. 1993; Tomassini et al. 1991; Zrinski et al. 2011) Inhibitorischen Effekt auf ECP zeigen die Immunsuppressiva Cyclosporin A sowie Dexamethason, Formoterol und Rapamycin. (Meng et al. 1997)

Der Antitumor Effekt, der eosinophilen Granulozyten zugeschrieben wird, ist mit den zytotoxischen Proteinen, wie auch ECP, assoziiert. ECP verfügt über die Eigenschaft Zellen oder kleinste Organismen zu schädigen, in dem es Poren in der Zellmembran verursacht und so die Phospholipid-Doppelschicht destabilisiert. Dies führt zur osmotischen Lyse der Zelle. (Koh et al. 2007; Pereira et al. 2011; Young et al. 1986) ECP verfügt ebenfalls über immunregulatorische Funktionen wie die Inhibition von T-Zell Proliferation sowie die Hochregulation von Rezeptoren und Oberflächenmolekülen. Ein weiterer Effekt von ECP ist der Gewebeumbau, der insbesondere bei Asthma eine Rolle spielt. (Boix et al. 2008; Venge et al. 1999)

Da eosinophile Granulozyten eine wichtige Funktion in der Pathogenese von Asthma haben, sind auch die Proteine aus ihren Granula hier entscheidend. Es wurde festgestellt, dass die Höhe von ECP im Blut mit Atemwegsinfektion bei allergischem Asthma korreliert und ist so ein nützlicher Marker für die Aktivität dieser Erkrankung. Auch im Sputum von Asthma Patienten können erhöhte ECP Level festgestellt werden. Nichtsdestotrotz ist das ECP Serum Level sehr variabel. Dies ist zurückzuführen auf genetische Faktoren, sodass die Höhe von ECP im Blut von Geschlecht, BMI und Empfindlichkeit der Atemwege beeinflusst wird. (Cianchetti et al. 2014; Elmoose et al. 2014; Koh et al. 2007)

Auch andere atopische Krankheiten, wie die atopische Dermatitis, sind mit einer ECP Erhöhung assoziiert. ECP Serum Level bei Patienten mit atopischer Dermatitis waren deutlich erhöht und korrelierten mit der Schwere der Erkrankung. Eine Verbesserung der Hauterkrankung führte wiederum zu einer Erniedrigung der Konzentration im Blut. (Kapp et al. 1993)

In dieser Arbeit wurde die Relevanz von eosinophilen Granulozyten für die körpereigene Tumorabwehr bereits beschrieben. Dieser Mechanismus scheint vorrangig über die Freisetzung ihrer zytotoxischen Proteine zu funktionieren. Nachdem Eosinophile von chemotaktischen Faktoren ins Tumorbett gelockt wurden und in Kontakt mit Tumorzellen, vor allem nekrotischen, standen, degranulieren sie. Mit ihrer Degranulation werden ECP sowie andere zytotoxische Proteine aus den Granula freigesetzt und sorgen für die Lyse der umliegenden Zellen. (Caruso et al. 2011; Cormier et al. 2006; Shi et al. 2004) Es wurde demonstriert, dass ECP für Hodgkin Lymphomzellen toxisch ist und zu ihrer Eradikation beiträgt. ECP zeigte nicht für alle heterogenen Zellen des Hodgkin Lymphoms dieselbe dosisabhängige Wirkung, doch wirkte es auf alle Zelltypen zytotoxisch. (Glimelius et al. 2011)

Mit seinen spezifischen Eigenschaften verleiht ECP seiner Ursprungszelle, dem eosinophilen Granulozyt, diese einzigartigen Fähigkeiten. Eine Aktivierung eines Eosinophilen kann zu seiner Degranulation führen und damit zur Freisetzung seiner potentesten Abwehrstoffe.

1.5.5 EPX

Die Eosinophile Peroxidase (EPX) ist ein weiteres Enzym der eosinophilen Granulozyten. Wie ECP ist es in ihren Granula gespeichert und wird bei Aktivierung der Eosinophilen sezerniert. EPX ist ein Häm enthaltendes Glykoprotein, das zur Familie der Oxidoreduktasen gehört. Seine Funktion ähnelt der der Myeloperoxidase, Lactoperoxidase und Thyreoperoxidase. (Ten et al. 1989; Zederbauer et al. 2007)

Wie die Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten, wird EPX von Eosinophilen bei Zeichen einer Infektion in das Gewebe sezerniert. Beide Enzyme bilden reaktive Sauerstoffspezies, die beispielsweise bakterielle Zellmembranen schädigen und so die körpereigene Abwehrreaktion unterstützen. Diese Sauerstoffproduktion beginnt mit der Synthese von Superoxid Anion durch die membrangebundene NADPH Oxidase der Eosinophilen, welche Wasserstoffperoxid (H_2O_2) generiert. Wasserstoffperoxid kann von EPX genutzt werden um aus Halogenen, wie Bromid oder Chlorid, hypohalogene Säuren zu erzeugen. Thiocyanat ist jedoch das bevorzugte Substrat und wird in Hypothyocyanatsäure umgewandelt. Diese Halogensauerstoffsäuren sind sehr potente Oxidantien. (Acharya et al. 2014; van Dalen et al. 2001; Furtmüller et al. 2006) Des Weiteren wird EPX eine wichtige Rolle in der Eosinophilopoese zugeschrieben. In Major Basic Protein (MBP) und EPX knockout Modellen konnte demonstriert werden, dass ohne jene Proteine die Proliferation von eosinophilen Granulozyten stagniert. Vorläuferzellen ohne EPX und MBP durchlaufen den Prozess der Apoptose, sodass in jenen knockout Modellen ein kompletter Verlust von eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut festzustellen war. Mögliche Erklärungen vermuten genregulatorische Mechanismen, die durch jene Enzyme beeinflusst werden und die für die Selbsterneuerung der Eosinophilen essentiell sind. Weiterhin wird suggeriert, dass die Expression der Granulaproteine, zu denen EPX und MBP zählen, während der Entwicklung ein existentieller Checkpoint für weitere Proliferation der jungen Zellen ist. (Ackerman et al. 2013; Doyle et al. 2013)

Nicht nur bei zellulärer Proliferation, sondern auch bei Migration und Invasion wird EPX eine wichtige Funktion zugeschrieben. Außerdem stimuliert das Enzym, wie auch die Myeloperoxidase, die Angiogenese. (Panagopoulos et al. 2015)

So wie für ECP, wird auch die Rolle von EPX in der Pathogenese von Asthma beleuchtet. Wie bereits beschrieben, führt die physiologische Aktivität von EPX zur

Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Parasiten und anderen Pathogenen oxidativen Schaden zufügen sollten. Jedoch greifen ROS auch am Ort der Sekretion das umliegende Gewebe an. EPX trägt somit zu Veränderung der Atemwege bei Asthmapatienten bei. Des Weiteren nutzen Eosinophile EPX als Katalysator für die Aufnahme von Stickoxid (NO). EPX bilden aus Stickoxid Oxidantien, die zu 3-Nitrotyrosin reagieren können. Durch diesen Reaktionsweg mit Stickoxid als Substrat, wird die NO-abhängige Bronchodilatation inhibiert, was die Obstruktion der Atemwege von Asthmapatienten verstärkt. (Brennan et al. 2002; MacPherson et al. 2001; Wang et al. 2016) Außerdem konnte EPX als valider Marker für Eosinophile Granulozyten und deren Granulation in Sputum von Asthmapatienten etabliert werden. (Nair et al. 2013)

Durch seine Granulaproteine EPX, ECP, MBP und EDN erlangt der eosinophile Granulozyt ungewöhnliche Fähigkeiten. Er ist in der Lage mittels der zytotoxischen Proteine seiner Granula Krankheitserreger wie Bakterien oder Parasiten zu zerstören. Genauso wie Krankheitserreger kann er maligne entartete, körpereigene Zellen angreifen und somit die körpereigene Tumor-Immunantwort unterstützen.

1.6 Ziele der Dissertation

In dieser Dissertation soll der Effekt von eosinophilen Granulozyten und CD8+-T-Effektorzellen im Malignen Melanom analysiert werden. Der aktuelle Stand der Tumorummunforschung zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen intratumoralen Immunzellinfiltraten und einer verbesserten Prognose. Eine zentrale Zellpopulation, die für dieses Phänomen verantwortlich ist, können eosinophile Granulozyten sein. In einem Melanommausmodell konnte gezeigt werden, dass Eosinophile in der Tumormikroumgebung durch verschiedene Effekte aktiv zur Tumorummunabwehr beitragen. Sie sezernieren Zytokine und Chemokine, die wiederum CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten in die Tumormikroumgebung locken und so einen zellulären Antitumoreffekt herbeiführen. Des Weiteren beeinflussen Eosinophile die strukturelle Mikroumgebung des Tumors zu dessen Nachteil. Die Angiogenese des Tumors wird inhibiert, sodass es zu einer Normalisierung der Tumervaskularisation kommt. Außerdem wird der M1-Aktivierungszustand von tumorinfiltrierenden Makrophagen gefördert. Makrophagen können in ihrem M1 Zustand ebenfalls die Tumorummunabwehr fördern und assoziieren mit einer verbesserten Prognose.

Diese Effekte werden durch die Infiltration von eosinophilen Granulozyten entweder initiiert oder verstärkt. Erste Daten weisen darauf hin, dass lediglich aktivierte Eosinophile zu diesen Funktionen in der Lage sind. Um die Aktivitätszustände von eosinophilen Granulozyten in der Tumormikroumgebung und deren Effekt auf die Prognose des Malignen Melanoms tiefergehender zu untersuchen, wurde diese Studie konzipiert.

Es wurden Immunzellmarker ausgewählt, die entweder als Oberflächenmarker für eine Aktivierung von Eosinophilen und T-Lymphozyten (CD8, CD69, CD44) sprechen oder als Granulaproteine (ECP, EPX) bei Aktivierung von Eosinophilen sezerniert werden. In dieser Studie untersuchten wir Gewebeschnitte von melanozytären Naevi, Malignen Melanomen und Melanommetastasen, die zuvor mit Antikörpern der ausgewählten Proteine eingefärbt wurden, histologisch auf CD8+-T-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten. Wir bestimmten die Zellzahl positiv eingefärbter Zellen und korrelierten diese Daten mit Parametern des Tumorgewebes sowie mit klinischen Verlaufsparmetern der Patienten.

Das Ziel dieser Arbeit ist es Aktivierungsmarker eosinophiler Granulozyten zu identifizieren und den Effekt von aktivierten eosinophilen Granulozyten (sowie deren Interaktion mit T-Lymphozyten) auf die Prognose des Malignen Melanoms zu bestätigen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studienkonzept

Die vorliegende Arbeit besteht aus Daten einer retrospektiven Untersuchung zweier Tissue Micro Arrays mit 322 Gewebestanzen von 47 Patienten und Patientinnen der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsklinik Mannheim. Die Gewebestanzen wurden aus Malignen Melanomen, Melanommetastasen und melanozytären Naevi entnommen. Über einen Zeitraum von 7 Jahren wurden die an Malignem Melanom erkrankten Patienten überwacht und ihr Progress dokumentiert. Bei Metastasierung wurde ebenfalls eine Probe aus dem metastasierten Gewebe entnommen. So konnten die primären Malignen Melanome in metastasierte und nicht-metastasierte Tumore unterteilt werden. Jeder Patient ist durch eine Gewebeprobe eines Melanoms sowie eines melanozytären Naevus oder durch die Probe eines Melanoms und einer Metastase vertreten.

Der histopathologische Typ jeder Gewebeprobe wurde durch zwei unabhängige Dermatohistopathologen des Zentrums festgelegt. Des Weiteren wurde für jede Probe die Tumordicke nach Breslow, die Invasionstiefe nach Clarke sowie vorhandene Ulzeration und die Mitoserate bestimmt. Zur Diagnosesicherung erfolgten Spezialfärbungen mittels Immunhistochemie gegen S100B, HMB45 und Ki67. Außerdem wurden die Daten aller Patienten zu Erstdiagnose, Exzisionsort, Datum der Exzision, Dauer der Erkrankung, Rezidive, Therapien, Nebendiagnosen und Tod elektronisch registriert.

Die beiden, in dieser Arbeit herangezogenen TMAs wurden im Rahmen zweier Dissertationsprojekte der Arbeitsgruppe Gebhardt der Klinik für Dermatologie an der Universitätsmedizin Mannheim in Zusammenarbeit mit der NCT Gewebebank des Pathologischen Instituts am Universitätsklinikum Heidelberg erstellt. Jene TMAs wurden für diese Arbeit für eine Immuninfiltratanalyse mit Schwerpunkt auf eosinophilen Granulozyten zur Verfügung gestellt. Die Gewebestanzen wurden mittels Immunhistochemie eingefärbt und so unterschiedliche, mit Eosinophilen assoziierte Proteine sichtbar gemacht. Folgende Proteine wurden markiert: CD8, ECP, EPX sowie CD69 und CD44. Die anschließende Analyse der gefärbten Tissue Micro Arrays erfolgte mittels Lichtmikroskopie und einer hochauflösenden Mikroskopkamera. Zusätzlich wurden die TMAs digitalisiert. Die gefärbten Proben wurden mittels händischer Auszählung nach zuvor festgelegtem Scoring unter Verwendung des Programms NDP.view2 analysiert. Die daraus resultierenden Rohdaten wurden einer Analyse zur Korrelation der Expressionsdaten mit klinischen Parametern wie Diagnose und Risikofaktoren unterzogen.

2.2 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Studie besteht aus Patienten der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Mannheim. Im Rahmen der Patientenakquise gab jeder Patient sein Einverständnis zur Verwendung seiner Gewebeproben und klinischer Daten für Forschungszwecke, was durch eine

Unterschrift dokumentiert wurde. Des Weiteren wurde die Studie mit den Ethikvoten 2010-318N-MA und 2014-875R-MA genehmigt.

Es wurden ausschließlich Gewebeproben von Patienten verwendet, die durch mindestens je eine Probe eines primären Melanoms und eines korrespondierenden Naevus oder eines primären Melanoms sowie einer Melanommetastase vertreten sind. Im Fokus standen vor allem Proben von Patienten, die mehrere primäre Melanome, Naevi oder Melanommetastasen besaßen, da es von besonderem Interesse war, diese miteinander zu vergleichen. Patienten, die diesen Kriterien entsprechen, sind sehr selten. In einem Zeitraum von 7 Jahren, fanden sich jedoch 47 Patienten, die jene Charakteristika aufweisen. Die analysierten Patienten haben einen Altersdurchschnitt von 65 Jahren. 61,7% der Teilnehmer sind männlichen Geschlechts, sodass 38,3% der Probanden weiblich sind.

Den Patienten aus diesem Kollektiv wurden jeweils mehrere Proben entnommen. Melanompatienten wurden zusätzlich zu Melanomproben auch Proben assoziierter Naevi entnommen. Patienten mit Melanomen und Melanommetastasen gaben ebenfalls Proben beider Tumoren ab. Von den insgesamt 322 untersuchten Stenzen stammen 76 Stenzen von melanozytären Naevi, 106 Stenzen von primären Melanomen und 140 Stenzen von Melanommetastasen. Die melanozytären Naevi setzten sich aus Compound Naevi, junctionale, lentiginöse und dermale Naevi sowie Naevus bleu zusammen. Mit 47,4% ist der Compound Nävus der häufigste histologische Typ. Die primären Melanome wurden ebenfalls in histologische Typen unterteilt. Hierzu gehören das superfiziell-spreitende Melanom, das noduläre und akral-lentiginöses Melanom sowie das Lentigo-Maligna-Melanom. Die am häufigsten vertretenen Melanome sind das superfiziell-spreitende Melanom (31%) sowie das noduläre Melanom (21,4%). Die Melanommetastasen wurden in lokoregionäre Metastasen sowie Fernmetastasen unterteilt, wobei der Anteil der lokoregionären Metastasen mit 85% den signifikant größeren Anteil ausmacht.

Die Stadien der Melanome wurden nach TNM-Klassifikation sowie nach AJCC Klassifikation bestimmt. Des Weiteren wurden Prognosemarker wie Ulzeration, Breslow Index und Mitoserate analysiert. 10% der primären Melanome wiesen eine Ulzeration auf. Zusätzlich wurde der UV-Schaden der entnommenen Proben histologisch bestimmt. Hier zeigte sich ein signifikanter UV-Schaden bei 19,6% der Gewebeproben.

2.3 Histologische Methoden zur Herstellung eines Tissue-Microarrays und Immunhistochemie (IHC)

Das Verfahren zur Herstellung und Verwendung eines Tissue-Microarrays ist eines der Neueren in der Pathologie. Ein Microarray erlaubt die Analyse einer großen Anzahl von Proben in kurzer Zeit, da auf einem Objektträger viele, kleine Gewebeproben von verschiedenen Probanden repräsentiert sind. Ein Vorteil dieser Methode ist folglich ein geringer Materialverbrauch bei gleichzeitig großer Anzahl zu erhaltener Datensätze. Die Tissue-Microarrays dieser Arbeit wurden mir von der Arbeitsgruppe Gebhardt der Klinik für Dermatologie an der Universitätsmedizin Mannheim in Zusammenarbeit mit der NCT Gewebepank des Pathologischen Instituts am Universitätsklinikum Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung eines Tissue-Microarrays werden ausgestanzte Gewebezylinder verschiedener Proben auf einem Paraffinblock zusammengesetzt. Jede Stanze weist einen Durchmesser zwischen 0,6 und 2 mm auf, sodass auf einem Objektträger 50 bis

400 Proben Platz haben. Trotz kleiner Größe der Gewebeproben konnte gezeigt werden, dass die Stanzen den Zellstatus des gesamten Tumors repräsentieren. (Cianchetti et al. 2014; Elmoose et al. 2014; Koh et al. 2007)

Die Gewebeschnitte dieser Arbeit wurden vor Stanzung mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt. Ein Dermatohistopathologe markierte pro Schnitt jeweils zwei histologisch interessante Areale (Region-of-interest) innerhalb des Malignen Melanoms, des Naevus und der Metastase mit einem feinen Markerstift. Dabei wurden Nekrosezonen und Melanomzell-arme Bereiche ausgespart. Aus jeder Region wurden an der NCT Gewebebank des Pathologischen Instituts am Universitätsklinikum Heidelberg zwei zylinderförmige Stanzen entnommen und durch ein semiautomatisches System (Becher Instruments, Silver Spring, MD) in einen Paraffinblock plaziert. Auf dem TMA1 wurden Proben der Stanzgröße 0,3 mm² und auf dem TMA2 der Größe 1 mm² angeordnet.

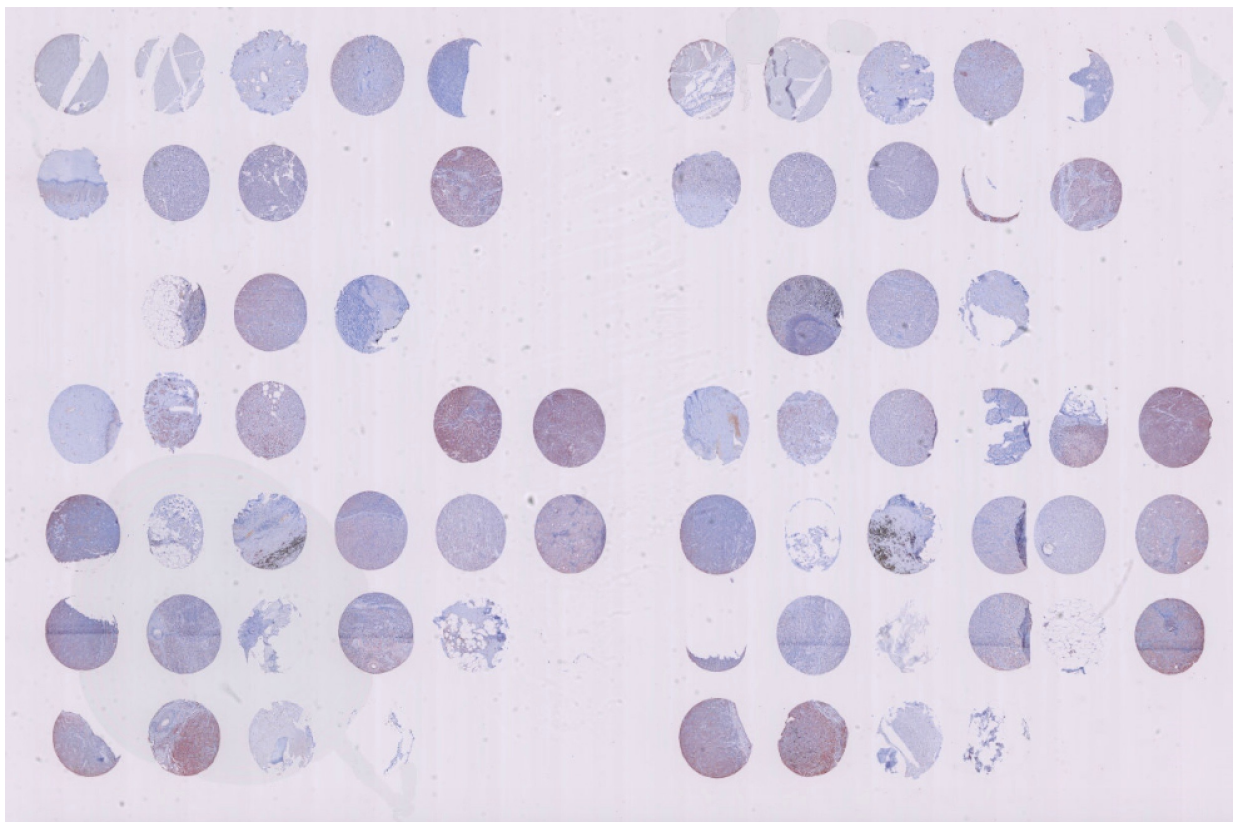


Abbildung 3 Mikroskopische Darstellung von TMA2 (ECP+ eingefärbt) Vergrößerung: 0,5x

Mit Hilfe eines Weichschnitt-Mikrotoms wurden 1 µm Schnitte des TMA-Blocks angefertigt und auf je einem Objektträger platziert. Zum Aushärten wurden die Objektträger über Nacht bei 60°C inkubiert. Die Schnitte wurden auf jedem Objektträger gekennzeichnet und ihre Reihenfolge notiert, um die Möglichkeit von Parallelschnitten für Färbungen zu gewährleisten.

Anschließend konnten die TMAs sowie die einzelnen Präparate immunhistochemisch angefärbt werden.

Tabelle 2 Verwendete Primärantikörper

Name	Katalog Nr.	Verdünnung im Blockpuffer	Inkubationsbedingungen	Hergestellt in	Lagerung bei [°C]
	Hersteller				
CD8	ab4055 abcam	1:500 (Dako Antibody Diluents)	Über Nacht in Feuchtkammer 4°C	Kaninchen (K4009)	-20
RNAse3/ ECP	ab116017 abcam	1:150 (Dako Antibody Diluents)	Über Nacht in Feuchtkammer 4°C	Kaninchen (K4009)	4
EPX	ab104530 abcam	1:200 (Dako Antibody Diluents)	Über Nacht in Feuchtkammer 4°C	Kaninchen (K4009)	-20
CD69	Ab202909 abcam	1:200 (Dako Antibody Diluents)	Über Nacht in Feuchtkammer 4°C	Kaninchen (K4009)	-20
CD44	DF1485 abnova	1:150 (Dako Antibody Diluents)	Über Nacht in Feuchtkammer 4°C	Maus (K4005)	4

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquellen (Hersteller; Katalog Nr.)
Aqua dest.	Fresenius Kabi; 13GGP021
Dako Antibody Diluent	Dako; S0809
Dako Mounting Medium	Dako; S3025
Dako Pen	Dako; S2002
Ethanol	Roth; K928.4
Haematoxylin	Merck; 1.09249-2500
HIER Citratpuffer	Zytomed; ZUC052-500
Peroxidase Block	Dako Kit; K4009/K4005
TBS	Zytomed; ZUC052-500
TBStween 20	Sigma-Aldrich; P7949-500ML
Xylol	Sigma-Aldrich; 33817-2,5L

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle (Hersteller; Katalog Nr.)
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Einwegpipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger	R. Langenbrinck; 03-0060

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Geräte	Bezugsquelle (Hersteller; Katalog Nr.)
Humidified Box	Simport
ImageQuant LAS biomolecular imager	ImageQuant LAS biomolecular imager
Kühlschrank 4°C	Liebherr; 042.KÜS.207
Mikroskop System ECLIPSE TI	Nikon
Wasserbad 100°C	Memmert; Typ WNB 10
Weichschnitt Mikrotom	Leica; RM2065

Tabelle 6: Verwendete Software

Software	Bezugsquelle (Hersteller; Katalog Nr.)
GraphPad PRISM	GraphPaf Software, Californien
NDP.view2	Hamamatsu Photonics K.K., Japan
NIS Elements	Nikon, Mannheim

Die TMA Paraffinschnitte wurden zuerst einer Deparaffinierung unterzogen. Dazu wurden sie dreimal 5 Minuten in einer Xylollösung inkubiert, um anschließend mit Ethanol, in absteigender Konzentration (100%, 90%, 80%, 70%), jeweils drei Minuten rehydriert zu werden. Danach wurden die Schnitte mit Aqua dest. 15 Sekunden lang gespült. Nun konnten die Objektträger für 5-10 Minuten mit TBS gewaschen werden, um anschließend in HIER Zitratpuffer (pH 6,0, Zytomed ZUCO028-500) bei 100°C für 60 Minuten im Wasserbad gekocht zu werden. Die Schnitte kühlten nun 20-30 Minuten ab und konnten währenddessen mit einem DakoPen umkreist werden. Nach dem Abkühlen wurden die Objektträger erneut für 15 Sekunden mit Aqua dest. gespült und daraufhin zweimal mit TBS 5 Minuten lang inkubiert. Die Präparate wurden nun 5 Minuten mit TBS-tween 20 (1%) hydriert, um danach in Peroxidase Block 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer zu inkubieren. Anschließend wurden sie zweimal mit TBS für je 5 Minuten gewaschen. Danach wurden die Objektträger ein weiteres Mal 5 Minuten in TBST inkubiert.

Da fünf verschiedene Antikörper untersucht werden sollten, wurde für jeden Antikörper das spezifische Verfahren der immunhistochemischen Färbung angewendet.

Die Objektträger wurden mit primärem CD8 Antikörper (ab4055) abcam 1:500 mit Dako Antibody Diluents' (SO809) über Nacht in einer feuchten Kammer in 4°C inkubiert. Für die Negativkontrollen (Sekundärantikörper-Kontrollen) wurde kein Primärantikörper verwendet. Nach der Inkubation wurden die Schnitte zweimal mit TBS jeweils 5 Minuten gewaschen und anschließend mit TBS-tween 20 (1%) wiederum 5 Minuten hydriert. Nun konnten sie 60 Minuten mit dem sekundären Antikörper Dako EnVision System-HRP (Rabbit K4009) bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert werden. Danach wurden die Objektträger erneut zweimal in TBS 5 Minuten lang gewaschen und ebenfalls 5 Minuten in TBS-tween 20 (1%). Danach wurde 1 Tropfen AEC aufgetragen und 10-30 Minuten inkubiert. Mit Aqua dest konnte nun das AEC gespült werden, um die Schnitte für 7 Minuten mit Haematoxylin 1:10 zu färben. Danach wurden die Objektträger zweimal 3-5 Minuten mit Leitungswasser gespült und erneut zweimalig mit Aqua dest. Schließlich konnten die Schnitte mit Dako Mounting Medium (S3025) und Glas blasenfrei eingedeckelt werden.

Die primären Antikörper Anti-RNase3/ECP (ab116017) abcam 1:150 wurden ebenfalls mit den Objektträgern in Dako Antibody Diluents' (SO809) über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Wiederum wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten mit TBS und anschließend 5 Minuten mit TBS-tween 20 (1%) gewaschen. Nun konnten die Objektträger 60 Minuten mit dem sekundären Antikörper Dako EnVision System-HRP (Rabbit K4009) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert werden. Es folgten daraufhin dieselben Arbeitsschritte zum Färben der Schnitte, wie zum Färben des CD8 Antikörpers.

Der primäre Antikörper Anti-EPX (ab104530) abcam 1:200 mit Dako Antibody Diluents (SO809) wurde auf dieselbe Weise, wie oben beschrieben, eingefärbt. Der sekundäre Antikörper war Dako EnVision System-HRP (Rabbit K4009).

Die beiden letzten Antikörper Anti-CD69 (ab202909) 1:200 mit Dako Antibody Diluents (SO809) und Anti-CD44 1:150 (DF-1485) Dako mit Dako Antibody Diluents (SO809) wurden ebenfalls mit den gleichen Arbeitsschritten, wie bereits beschrieben, angefärbt. Als sekundären Antikörper wurde für CD69 der Antikörper Dako EnVision System-HRP (Rabbit K4009) verwendet. Für CD44 wurde der sekundäre Antikörper Dako EnVision System-HRP (Mouse K4005) genutzt.

Alle Schnitte wurden mit Dako Mounting Medium (S3025) und Glas eingedeckelt.

Die Schnitte wurden anschließend lichtmikroskopisch analysiert, digital fotodokumentiert und schließlich mittels der Auswertungssoftware NPD.view2 (Hamamatsu Inc., Japan; Version U12388-01) analysiert.

2.4 Mikroskopisch-gestützte Auswertung der TMA Analyse

Mittels des Systems ECLIPSE TI (Nikon), bestehend aus einem Mikroskop, einer hochauflösenden Kamera und der korrespondierenden Software NIS-Elements, konnten die Gewebeschnitte mikroskopiert und fotografiert werden.

Das Mikroskop dieses Systems ist gleichzeitig mit Kamera und Computer vernetzt. Dadurch lässt sich das durch das Mikroskop zu sehende Bild auf dem Computer in der NIS-Elements Software darstellen. Per Joystick kann der Objektträger in der X-Y Ebene bewegt und das sichtbare Bild scharfgestellt werden. Dies ermöglicht eine gute digitale Analyse der Gewebeschnitte.

Um eine effektive und reproduzierbare Analyse zu garantieren, wurden Kriterien für die Fotografie festgelegt. Die Objektträger mit 0,3 mm² Stenzen wurden bei

100facher Vergrößerung fotografiert, da alle Zellen so gut voneinander zu trennen waren und dies die weitere Auswertung begünstigen würde. Dies konnte bei den Objektträgern mit 1 mm² Stanzen bei einer zehnfachen Vergrößerung festgestellt werden. Das Ziel, alle Stanzen vollständig auf ein Foto zu bekommen, konnte durch das regulierbare Zoom der Kamera erreicht werden. Für viele Objektträger war dies ohne Zoom (Einstellung 1,0) möglich. Die Restlichen wurden mit einer Zoomeinstellung 0,9 fotografiert, sodass alle Gewebeschnitte vollständig abgebildet werden konnten. Es bestand die Möglichkeit einer Änderung der Lichtfarbe. Da dies von geringem Interesse für diese Arbeit war, wurde die Lichtfarbe auf weiß belassen und mit Durchlicht gearbeitet.

Unter jenen Kriterien wurden jede der Stanzen sowie die einzelnen Präparate durch die Multikamera von Nikon digital abgebildet. Jedes Foto wurde mit einem Code versehen, durch welchen die genaue Herkunft jeder einzelnen Stanze nachzuvollziehen ist, und gespeichert.

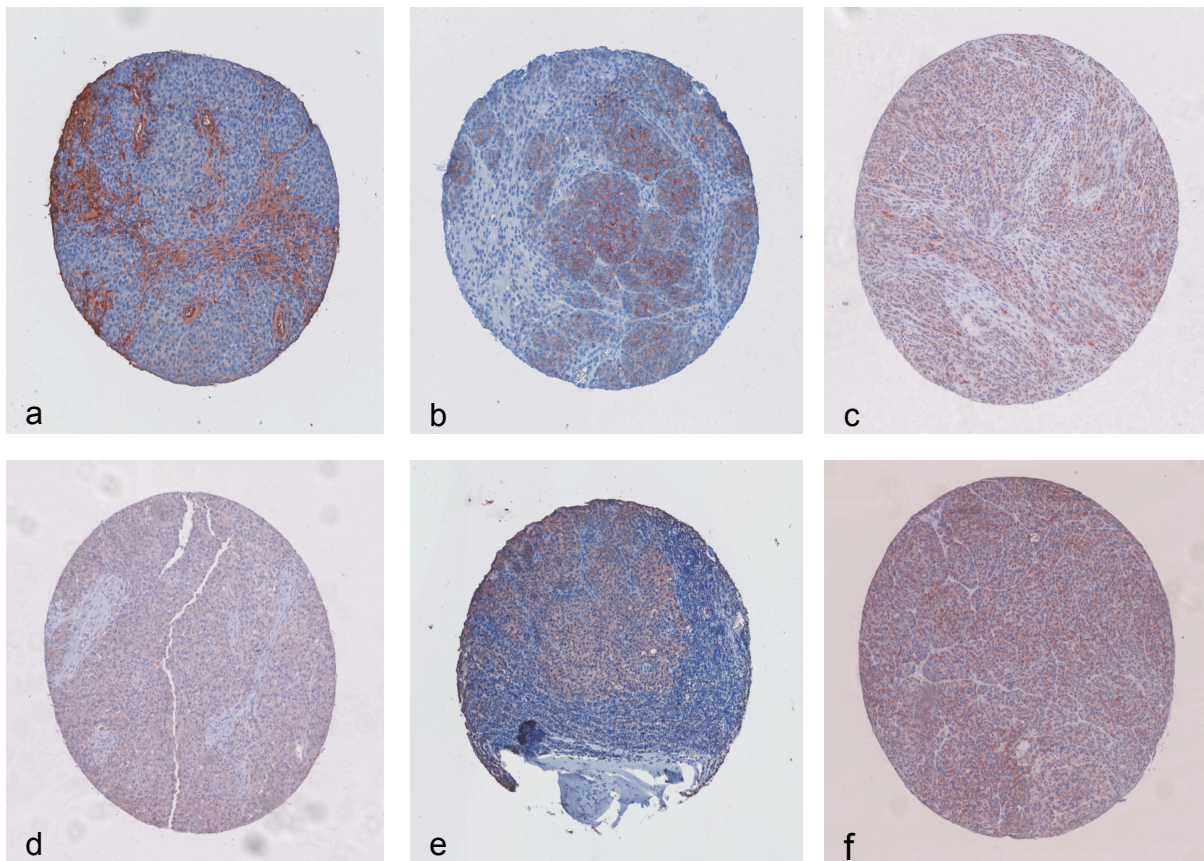


Abbildung 4 Photographien der Gewebeschnitte nach Immunhistochemischer Färbung (Vergrößerung: a-b: 6x; c-f 4x); a CD8+ eingefärbter Nävuszellnävus (TMA1); b CD44+ eingefärbtes Primärmelanom (TMA1); c CD69+ eingefärbtes Primärmelanom (TMA2); d CD69+ eingefärbte Lymphknotenmetastase (TMA2); e ECP+ eingefärbte Hautmetastase (TMA2); f EPX+ eingefärbte Lymphknotenmetastase (TMA2)

2.5 Bildanalyse

Die digitalisierten Fotos der immunhistochemisch eingefärbten Gewebestanden konnten mit Hilfe des Programmes NDP.view2 angesehen und ausgewertet werden. Durch das Programm konnte an die Schnitte herangezoomt werden, sodass einzelne Zellen gut zu differenzieren waren.

Zu zählen waren eosinophile Granulozyten, dessen Granula durch die IHC angefärbt waren. Andere Zellen sowie eosinophile Granulozyten ohne deutlich gefärbte Granula waren zu vernachlässigen. Des Weiteren galt die Differenzierung zwischen intratumoral und peritumoral gelegenen Eosinophilen, dessen Zahlen getrennt dokumentiert wurden. Auf den mit CD8+ eingefärbten Schnitten wurden Lymphozyten ausgezählt.

Außerdem wurde die Fläche der Stanze sowie die Tumor- und Stromaflächen prozentual beurteilt. Zum einen musste geschätzt werden, wie viel Prozent der Stanze aus Gewebe besteht. Von dieser Gewebefläche wiederum musste Tumor und Stromafläche unterschieden werden. Alle drei Flächen wurden in Prozent angegeben, wobei Tumor- und Stromafläche zusammen die gesamte Stanzgröße darstellten.

Jene Kriterien wurden auf alle Färbungen der beiden TMAs angewandt. Das Ziel dessen war, die Zahl der gefärbten eosinophilen Granulozyten pro mm² anzugeben.

Die Auszählung erfolgte zweifach, einmal durch einen verblindeten, dermatohistopathologischen geschulten Untersucher.

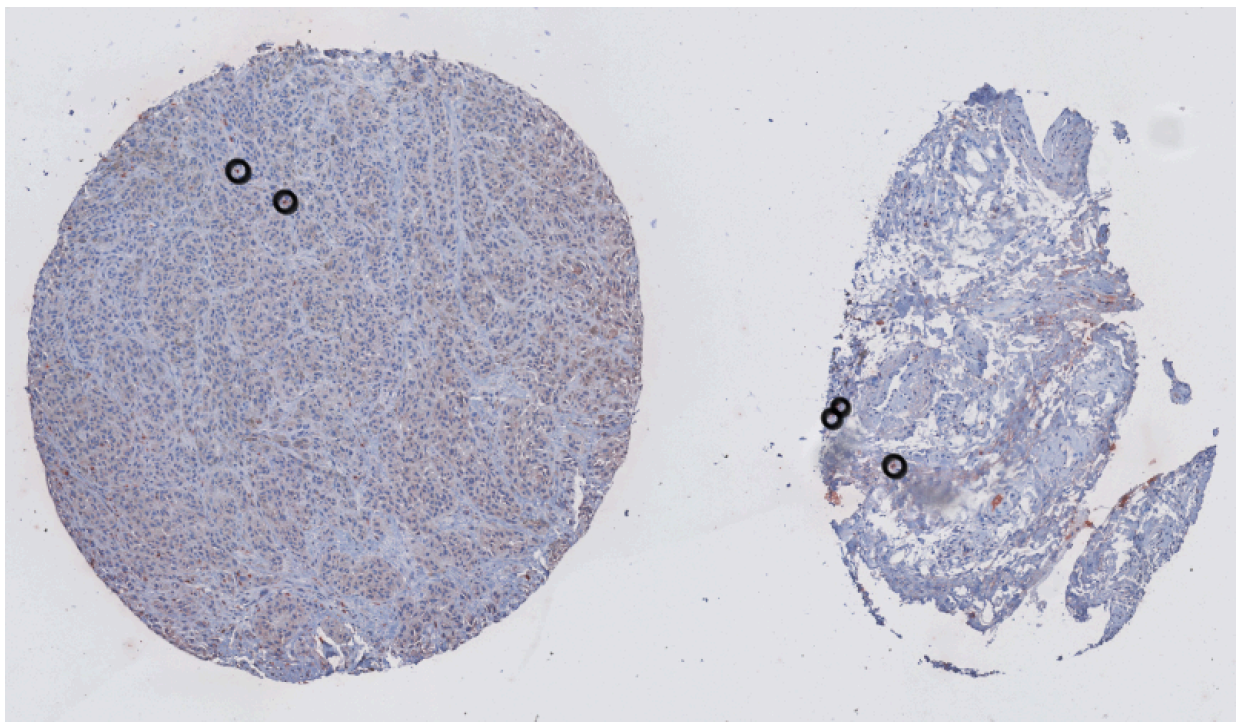


Abbildung 5 ECP+ gefärbte Schnitte zweier Primärmelanome von TMA2 mit ausgezählten eosinophilen Granulozyten (Vergrößerung 4x)

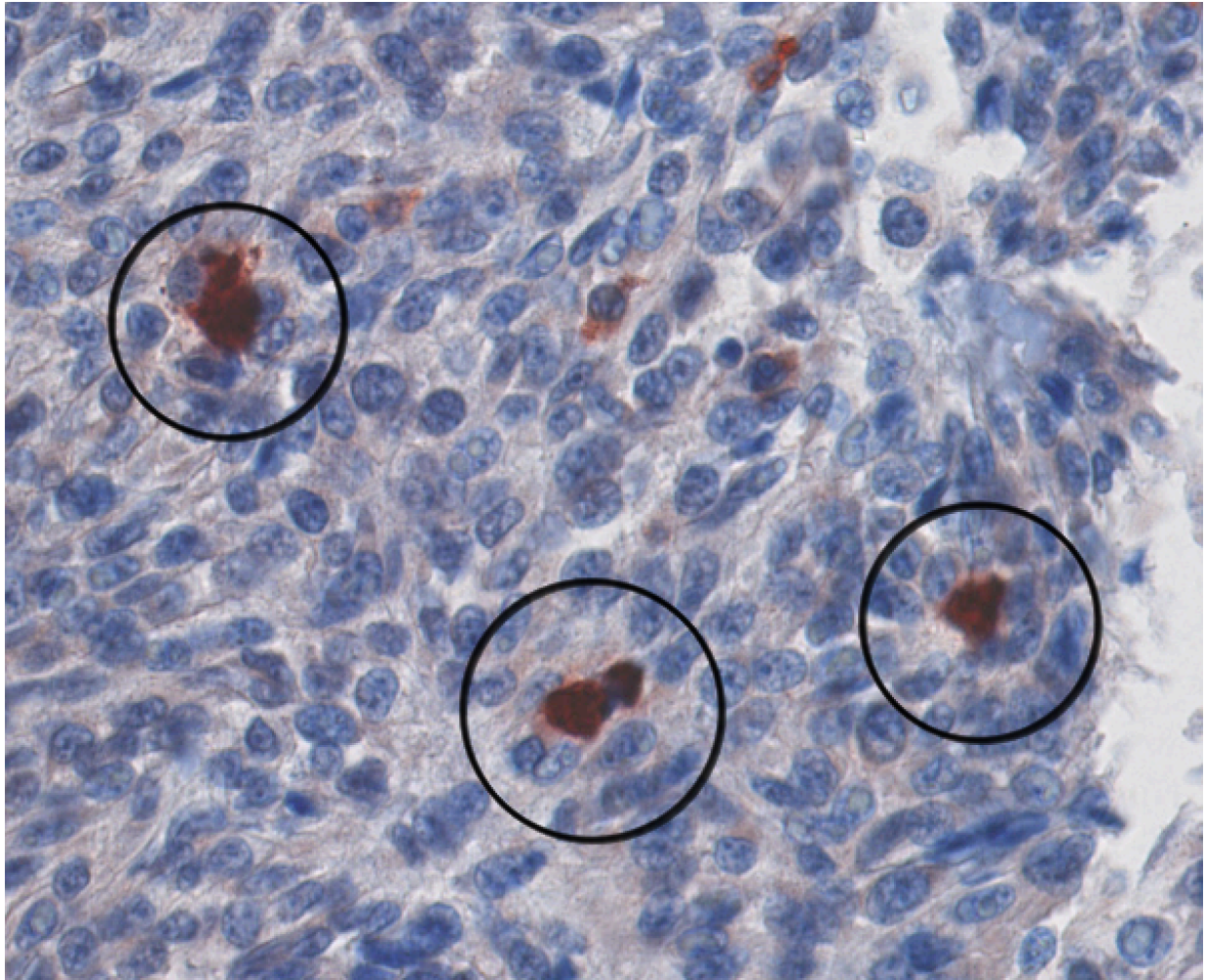


Abbildung 6 ECP+ gefärbte eosinophile Granulozyten auf einem Gewebeschnitt einer Hautmetastase von TMA2 mit NPD.view2 (Vergrößerung 25x)

2.6 Statistische Auswertung

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlich großen Stanzgen der beiden TMAs herzustellen, sollten die gezählten Zellen pro mm^2 angegeben werden. Diese Angaben konnten mit einer Excel Tabelle berechnet werden.

Zunächst wurde aus der Stanzgröße (%) die Stanzfläche (mm^2) errechnet, um daraus Tumorfläche (mm^2) und Stromafläche (mm^2) berechnen zu können. Nun konnten die gezählten, intratumoralen, eosinophilen Granulozyten auf die Tumorfläche (n/mm^2) und die peritumoralen auf die Stromafläche (n/mm^2) kalkuliert werden.

Tabelle 7: Beispielhafte Auswertung eines ECP+ Schnittes von TMA2

ECP+ TMA2		Block 1	Position	D10	D11
Gezählte Größen	Stanzgröße (%)			1	0,6
	Tumorgröße (%)			1	1
	Stromagröße (%)			0	0
	Intratumorale Pos. Zellen			2	3
	Peritumorale Pos. Zellen			0	0
Berechnete Größen	Stanzfläche (mm ²)			0,79	0,47
	Tumorfläche (mm ²)			0,79	0,47
	Stromafläche (mm ²)			0	0
	Intratumorale Pos. Zellen (n/mm ²)			2,53	6,37
	Peritumorale Pos. Zellen (n/mm ²)			0	0

Anschließend erfolgte eine weitere statistische Auswertung mit dem Programm Graph Pad Prism (Graphpad Software Inc., USA; Version 6).

Mit diesem Programm konnten zwei wichtige statistische Tests durchgeführt werden. Der Erste dieser Tests ist der Oneway-ANOVA Test. ANOVA steht für „Analysis of Variance“ und ist ein Test zur Prüfung der Signifikanz von Studienergebnissen. Der Test vergleicht 2 Faktoren von 2 Gruppen und zeigt ein signifikantes Ergebnis, wenn jene beiden Faktoren ungleich sind. Der One-Way ANOVA Test wurde ausgewählt, da pro Gruppe jeweils eine unabhängige Variable besteht, der Ursprung der Gewebestanze. Wenn die geprüften Faktoren einen signifikanten Unterschied aufweisen, bedeutet dies, dass die unabhängige Variable, die manipuliert wird, einen Effekt auf die gemessene Variable hat – die Anzahl der Eosinophilen pro mm².

Der Oneway-ANOVA Test wurde angewandt, um den Einfluss des Ursprungs der Gewebestancen auf die Anzahl der Eosinophilen zu analysieren. Die analysierten Gewebestancen stammen zum einen von melanozytären Naevi und zum anderen von Malignen Melanomen und Melanommetastasen. Es erfolgte eine weitere Unterteilung der Melanome in metastasierte und nicht metastasierte Melanome sowie eine Differenzierung von regionalen Metastasen und Fernmetastasen.

Die Analyse des Oneway-ANOVA Tests stellt jeweils zwei dieser Gruppen einander gegenüber und ermittelt, ob ein signifikanter Unterschied besteht. Es wurde folglich die Anzahl der ausgezählten positiven Zellen auf Schnitten der melanozytären Naevi mit der Anzahl der Zellen auf Schnitten des nicht metastasierten Malignen Melanoms verglichen. Daraufhin wurde die Anzahl der gezählten Immunzellen auf Gewebeschnitten des nicht metastasierten Melanoms mit der Anzahl der Zellen auf Schnitten von metastasierten Melanomen gegenübergestellt, usw. Diese Analyse wurde zum einen für ausgezählte, intratumorale Immunzellen sowie für peritumorale Immunzellen durchgeführt.

Des Weiteren wurden zusätzliche Faktoren hinzugezogen, um zu sehen, ob diese einen Effekt auf die Anzahl der T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten haben. Dies sind T-Stadium des Tumors, Breslow Index, Ulzeration sowie Lichtschaden.

Das T-Stadium der Tumoren wurde bei jedem Gewebeschnitt von erfahrenen Dermatohistopathologen histologisch ermittelt, nachdem die Gewebeprobe

entnommen wurde, und dokumentiert. So konnte mittels des Oneway-ANOVA Tests die Anzahl der intratumoralen und peritumoralen Immunzellen der unterschiedlichen T-Stadien miteinander verglichen werden.

Der Breslow Index wurde wiederum durch erfahrene Dermatohistopathologen nach Entnehmen der Gewebeprobe ermittelt. Somit konnte auch hier mittels des Oneway-ANOVA Tests eine Gegenüberstellung erfolgen.

Das Vorhandensein von Ulzeration wurde nicht bei jedem Patienten klinisch geprüft. Bei 83% der Schnitte ist bekannt, ob eine Ulzeration vorlag oder nicht. Dies wurde von Dermatologen vor Entfernen der suspekten Läsion dokumentiert. Für die Anzahl der Gewebeschnitte, deren Ulzerationsstatus bekannt ist, wurde ebenfalls eine Gegenüberstellung von Ulzeration und Anzahl der infiltrierenden Immunzellen durchgeführt.

Des Weiteren erfolgte eine Analyse des Effektes des Lichtschadens (photodamage) auf die Anzahl von tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten. Die Gewebeschnitte wurden bezüglich eines vorhandenen UV-Schadens histologisch untersucht. Dazu wurde die Degeneration von zellulären Kollagenfasern histologisch analysiert, da eine hohe Rate an Kollagen-Degeneration für einen UV-Schaden spricht. (Wagner et al. 2015) Insgesamt ließ sich das Vorhandensein eines UV-Schadens für 56,6% der Schnitte histologisch ermitteln. So konnte mittels des Oneway-ANOVA Test erneut eine Gegenüberstellung zwischen vorhandenem Lichtschaden (photodamage) und positiven Immunzellen sowie keinem UV-Schaden und ausgezählten Zellen erfolgen.

Der zweite Test, der zur Prüfung der Ergebnisse angewandt wurde, ist der Kruskal-Wallis-Test. Dieser ist ein Rangsummentest und dient der Überprüfung einer zentralen Tendenz von mehr als 2 unabhängigen Stichproben. Die Berechnung der Teststatistik basiert auf dem Vergleich von mehr als 2 Rangreihen unter der Annahme, dass sich die Daten zweier unabhängiger Gruppen in einer gemeinsamen Rangreihe verteilen, wenn sie die gleiche Tendenz aufweisen. Die aufgestellte Nullhypothese besagt, dass beide Gruppen gleich seien. Wenn die Nullhypothese widerlegt wird, bedeutet dies folgerichtig, dass die analysierten Gruppen keine gemeinsamen Tendenzen aufweisen. Je kleiner der berechnete p-Wert ist, desto ungleicher sind die betrachteten Paare. In dieser Studie bedeutet dies, dass Gewebeschnitte desselben Patienten verglichen werden. Ein signifikantes Ergebnis bestätigt, dass die zwei Proben eines Patienten ungleich also nicht identisch sind. Bei Ungleichheit der Proben eines Patienten können folglich beide Proben statistisch gewertet werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einführung

Die vorliegenden Ergebnisse wurden anhand einer Analyse von 322 Gewebestanzten von 47 Patienten und Patientinnen der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsklinik Mannheim erstellt. Es wurden Gewebestanzten aus Malignen Melanomen, Melanommetastasen sowie melanozytären Naevi entnommen. Jeder Patient ist durch mindestens eine primäre Melanomstanze und eine melanozytäre Naevusstanze oder durch eine Probe eines Melanoms und einer Melanommetastase vertreten. Des Weiteren wurden die Melanomproben in nicht metastasierte Melanome sowie metastasierte Melanome unterteilt. Außerdem erfolgte eine Differenzierung von regionalen Metastasen und Fernmetastasen. Insgesamt wurden 76 Stanzten von melanozytären Naevi, 106 Stanzten von primären Melanomen sowie 140 Stanzten von Metastasen in dieser Studie untersucht. Die Metastasen wurden in lokoregionäre Metastasen und Fernmetastasen unterteilt. Die lokoregionären Metastasen nehmen mit 85% den signifikant größeren Anteil ein.

Jede Probe wurde von erfahrenen Dermatohistopathologen beurteilt und analysiert. Es wurden für jede Probe die Tumordicke nach Breslow, das T-Stadium nach TNM-Klassifikation sowie vorhandene Ulzeration und die Mitoserate bestimmt. Die Gewebestanzten wurden daraufhin auf Tissue Micro Arrays angeordnet und mittels Immunhistochemie eingefärbt. Es wurden die Proteine CD8, CD69, CD44 und ECP sowie EPX markiert. Folglich konnte eine Analyse mittels Lichtmikroskopie und händischer Auszählung erfolgen.

Anschließend wurde eine statistische Auswertung der Daten anhand Graph Pad Prism durchgeführt. Zum einen wurde der Oneway-ANOVA Test angewandt. Dies ist ein Test, der zur Prüfung der Signifikanz von Studienergebnissen dient. Der Oneway-ANOVA Test prüft in dieser Studie den Einfluss des Ursprungs der Gewebestanzten auf die Anzahl der ausgezählten Eosinophilen. Die analysierten Gewebestanzten stammen von melanozytären Naevi, Malignen Melanomen und Melanommetastasen. Es wurde die Anzahl der ausgezählten, positiv eingefärbten Zellen auf Schnitten von beispielsweise melanozytären Naevi mit der Anzahl der Zellen auf Schnitten des nicht metastasierten Malignen Melanoms verglichen. Ein Testergebnis gilt bei einem p-Wert kleiner 0,05 als signifikant und bedeutet in diesem Beispiel, dass der Ursprung der Gewebestanzten einen signifikanten Effekt auf die Anzahl der ausgezählten Eosinophilen hat. Zusätzlich zum Ursprung der Gewebestanze wurden die Analysen für intratumoral und peritumoral gelegene eosinophile Granulozyten durchgeführt. Des Weiteren analysierten wir den Einfluss von T-Stadium des Tumors, Breslow Index, Ulzeration und UV-Schaden.

Weiterhin wurde der Kruskal-Wallis-Test zur Prüfung der Ergebnisse angewandt. Dieser statistische Test dient der Überprüfung einer zentralen Tendenz von mehr als 2 unabhängigen Stichproben. Es wurden die Gewebeschnitte desselben Patienten miteinander verglichen. Ein signifikantes Testergebnis bestätigt die Unabhängigkeit der zwei Proben des Patienten. Bei Ungleichheit der beiden Proben eines Patienten können beide statistisch gewertet werden.

Tabelle 8 Charakteristika des Patientenkollektivs und der TMA

		TMA1		TMA2		TMA 1+2	
TMA Eigenschaften		N	%	N	%	N	%
Stanzzylinder	Gesamt	136	100	186	100	322	100
	Auswertbar	60	44,1	153	82,3	213	66,2
Patienten	Gesamtzahl	26	100	21	100	47	100
	Medianes Follow-up (Monate (Bandbreite))	34,6 (0,6-97,5)		54,9 (0,4-156,9)		44,75 (0,4-156,9)	
Klinisch-pathologische Eigenschaften		N	%	N	%	N	%
Alter	Medianes Alter (Jahre (Bandbreite))	66,1 (45-92)		63,4 (46-81)		64,75 (45-92)	
Geschlecht	Männlich	17	65,4	12	57,1	29	61,7
	Weiblich	9	34,6	9	42,9	18	38,3
Histologie	Primäres Melanom	60	100	46	100	106	100
	SSM	28	46,6	2	4,4	30	28,3
	NM	10	16,7	16	34,7	26	24,5
	LMM	0	0	6	13	6	5,7
	ALM	4	6,7	6	13	10	9,4
	Andere	16	26,7	12	26,1	28	26,4
	Nicht klassifizierbar	2	3,3	4	8,8	6	5,7
T-Klassifikation	Tis	2	3,3	2	1,1	4	1,6
	T1	14	23,3	14	7,5	28	11,4
	T2	24	40,1	8	4,3	32	13
	T3	18	30	102	54,9	120	48,8
	T4	2	3,3	60	32,2	62	25,2
Ulzeration	Nein	28	46,7	28	60,9	56	52,8
	Ja	14	23,3	18	39,1	32	30,2
	Nicht bekannt	18	30	0	0	18	17
Lichtschaden	Nein	93	68,3	26	13,9	119	37
	Ja	43	31,7	20	10,8	63	19,6
	Nicht bekannt	0	0	140	75,3	140	43,4
Metastasierung im Beobachtungszeitraum	Nein	108	77,1	32	17,2	140	43,4
	Ja	28	22,9	154	82,8	182	56,6
Progressionsfreies Überleben (PFS)	Monate (Durchschnitt)	59,8		9,6		34,7	

Histologie	Naevi	76	100	0	0
	Compound	36	47,4		
	Junktional	16	21,1		
	Lentiginös	12	15,7		
	Dermal	10	13,2		
	Naevus bleu	2	2,6		
	Nicht klassifizierbar	0	0		

Histologie	Metastasen	0	0	140	100
	Lokoregionäre Metastasen			120	85,7
	Sub-/Kutane			62	44,4
	Lymphknoten			58	41,6
	Fernmetastasen			20	14,2
	Lunge			4	2,8
	Muskel			2	1,4
	Knochen			2	1,4
	Darm			4	2,8
	Leber			4	2,8
	Gehirn			2	1,4
	Nebenniere			2	1,4

Abkürzungen: ALM = akrolentiginöses Melanom, LMM = Lentigo-maligna-Melanom, N = Patientenzahl, NM = Noduläres Melanom, PFS = progressions-freies Überleben, SSM = Superfiziell spreitendes Melanom, TMA = Tissue Microarray.

Es wurden nur valide Stenzen für die statistische Analyse verwendet. Ausgewertet wurden nur Stenzen mit hoher Gewebsintegrität (mind. 90% Stanzfläche) und gelungener immunhistochemischer Färbung.

3.2 Marker CD8

CD8 ist ein Oberflächenprotein, das T-Lymphozyten als zytotoxische T-Zellen klassifiziert. Zytotoxische T-Zellen, auch T-Effektorzellen genannt, spielen eine entscheidende Rolle in der Tumorummunabwehr. Eosinophile Granulozyten des Tumorbetts sezernieren Chemokine, die T-Zellen in das Tumorbett attrahieren. Die Zusammenarbeit von Eosinophilen und zytotoxischen T-Zellen in Bezug auf Wachstumsinhibition des Tumors wurde erst kürzlich und lediglich in eigenen Grundzügen beschrieben. (Carretero et al. 2015)

In dieser Studie wurden histologische Schnitte eines Melanom-Patientenkollektivs immunhistochemisch angefärbt. Die Auswertung der Schnitte auf TMAs erfolgte lichtmikroskopisch anhand ausgewählter Kriterien. Es wurde die Anzahl der CD8+ Zellen getrennt nach intratumoraler sowie peritumoraler Lokalisation ausgezählt. Wir konnten auf unseren Gewebeschnitten CD8 positive Zellen sowohl in melanozytären Naevi (NZN), im primären Malignen Melanom, das in metastasiertes (MM met) und nicht metastasiertes (MM non-met) unterteilt wird, als auch in regionalen Metastasen (MET loco-reg) und in Fernmetastasen (MET distant) nachweisen. Daraufhin erfolgte die biostatistische Analyse mithilfe Graph Pad Prism.

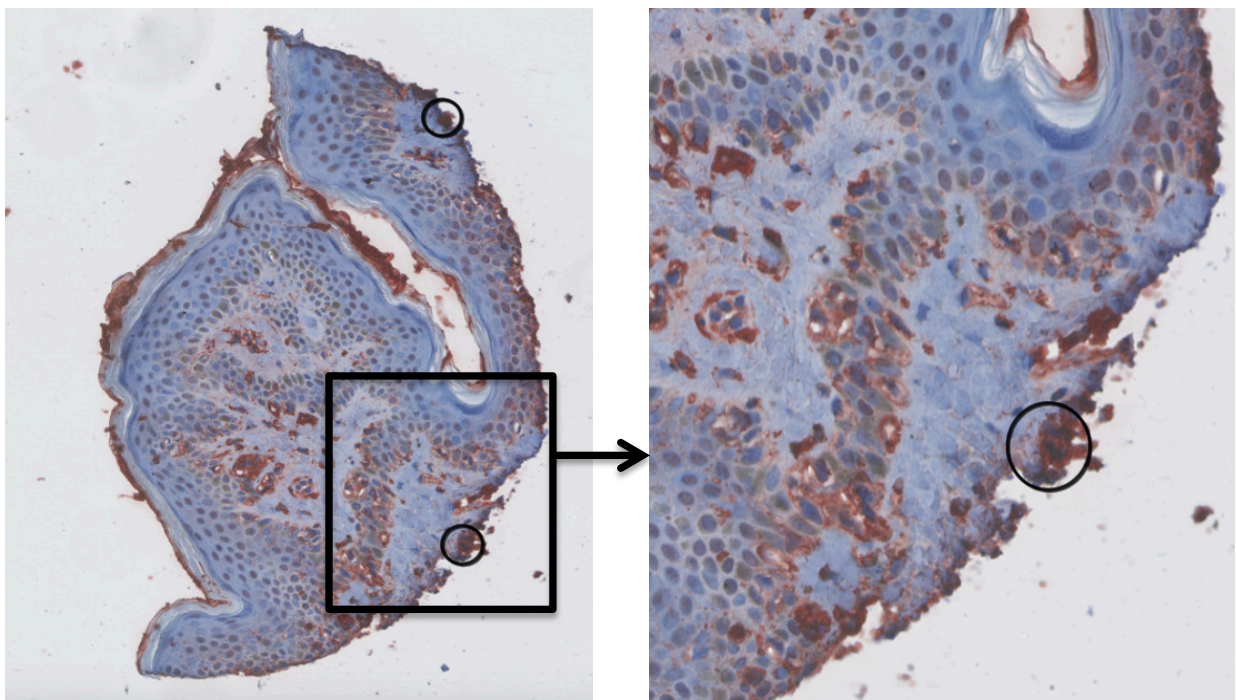


Abbildung 7 Analyse eines CD8+ eingefärbten Gewebeschnitts eines Primärmelanoms von TMA1 mit NP.view2 (Vergrößerung: Links 9x; Rechts 20x)

3.2.1 Intratumorale Expression

Die Anzahl der eingefärbten T-Zellen intratumoral sowie peritumoral wurde bezüglich der Gewebeschnittgruppen verglichen. Anhand des Oneway-ANOVA Test kann eine direkte Gegenüberstellung der ausgezählten Zellen in melanozytären Naevi, metastasierten und nicht metastasierten Melanomen sowie regionalen und Fernmetastasen erfolgen. Hierbei zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Anzahl intratumoraler CD8+ T-Zellen zwischen melanozytären Naevi und nicht metastasierten Melanomen ($p=0,0031$). Außerdem liegt ein höchstsignifikanter Unterschied zwischen nicht metastasierten Melanomen und metastasierten Melanomen ($p<0,0001$) vor. Dies wird in Abbildung 8 grafisch dargestellt. Die Anzahl an CD8+ T-Zellen ist am höchsten in nicht metastasierten Primärmelanomen.

Die peritumorale Auswertung ist statistisch nicht aussagekräftig. Die peritumorale Anzahl an ausgezählten CD8+ T-Zellen ist zu gering, sodass eine Auswertung nicht sinnvoll ist. Die Stanzten der Gewebeschnitte wurden gewählt, um einen möglichst großen Teil intratumorales Gewebe abzubilden. Folglich nimmt das peritumorale Gewebe prozentual einen sehr kleinen Teil der Gewebestanze ein. Aufgrund der geringen Zahl positiver Zellen, sahen wir von einer statistischen Auswertung ab.

Des Weiteren ist der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt worden, wodurch die Gleichheit von Proben desselben Patienten gegenüber gestellt wird. Auch dieser Test zeigt sich signifikant ($p=0,0137$) für die intratumorale Analyse. Dies bestätigt die Ungleichheit der Proben eines Patienten für CD8+ gefärbte Gewebeschnitte. Die Proben desselben Patienten können individuell gewertet werden.

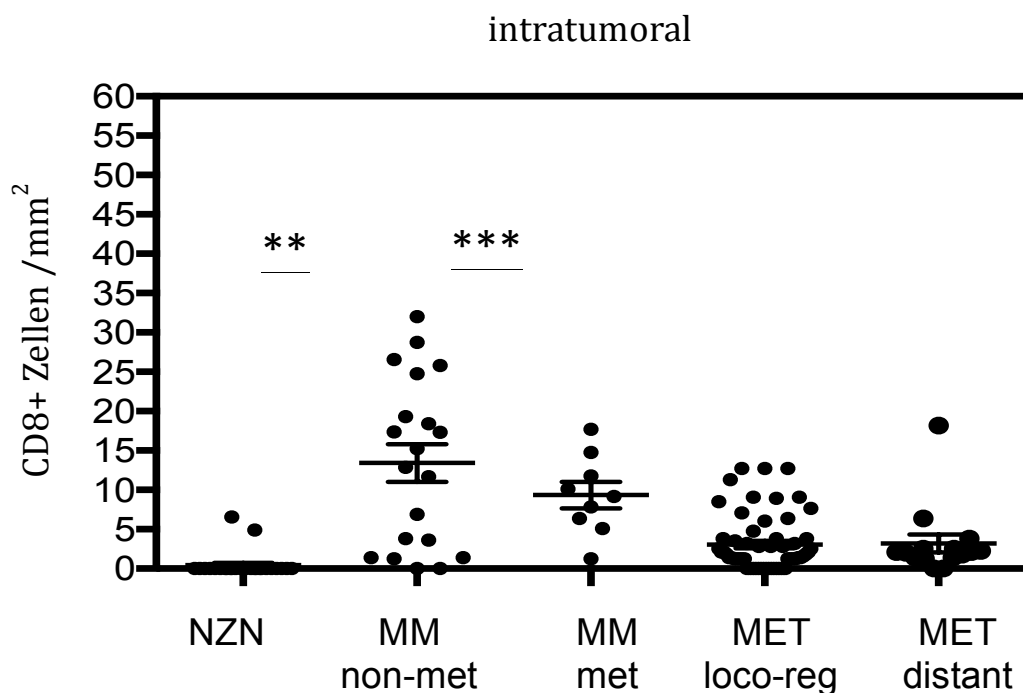


Abbildung 8 CD8+ Zellen intratumoral (NZN = melanozytäre Naevi; MM non-met = nicht metastasiertes Primärmelanom; MM met = metastasiertes Primärmelanom; MET loco-reg = lokoregionale Metastasen; MET distant = Fernmetastasen)

3.2.2 Expression in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden

Des Weiteren untersuchten wir den Effekt von UV-Schaden (Photoschaden) auf die Anzahl der positiven Immunzellen. Das Vorliegen von Lichtschäden wurde von erfahrenen Dermatohistopathologen histologisch determiniert. Durch die Analyse der Degeneration von Kollagenfasern kann der Grad an UV Schädigung ermessen werden. (Wagner et al. 2015) Wir untersuchten die ausgezählten Zellen im Hinblick auf ihre Anzahl auf Gewebeschnitten mit Lichtschaden und ohne Lichtschaden mittels des Oneway-ANOVA Tests. Hierbei zeigt sich eine höchstsignifikant erhöhte Anzahl an intratumoralen CD8+ T-Zellen in Schnitten von Patienten mit UV-Schaden ($p < 0,0001$). Dies stellt sich ebenfalls hochsignifikant für positive, peritumorale Zellen in Schnitten von Patienten mit UV-Schaden dar ($p = 0,00152$). Dies wird in Abbildung 9 abgebildet. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in Geweben mit UV-Schaden vermehrt intratumorale, wie auch peritumorale CD8+ T-Lymphozyten zu finden sind.

Weiterhin wurde eine Korrelation zwischen einer erhöhten Anzahl an positiven Zellen und dem T-Stadium des Tumors überprüft. Dies zeigt sich nicht signifikant.

Die Analyse einer Korrelation von Breslow Index und Zellzahl sowie Ulzeration und gezählter Zellen ist ebenfalls nicht signifikant.

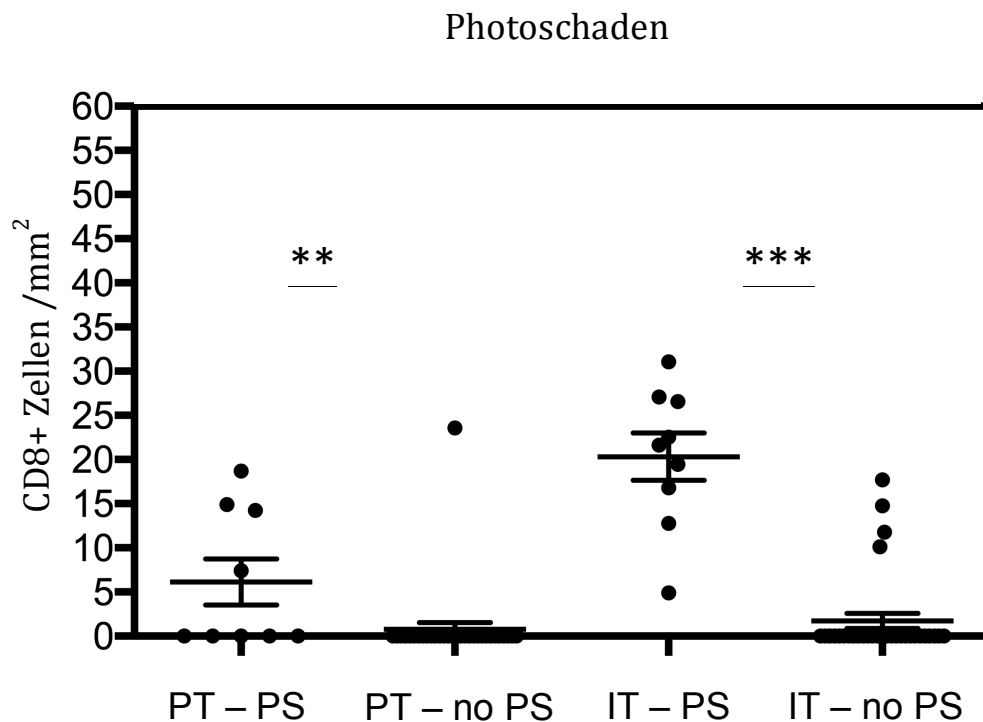


Abbildung 9 CD8+ Zellen in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden (PT-PS = peritumorale Zellen auf Gewebeschnitten mit Photoschaden; PT-no PS = peritumorale Zellen auf Gewebeschnitten ohne Photoschaden; IT-PS = intratumorale Zellen auf Gewebeschnitten mit Photoschaden; IT-no PS = intratumorale Zellen auf Gewebeschnitten ohne Photoschaden)

3.3 Marker CD69

CD69 ist ein Oberflächenprotein, das auf einer Vielzahl hämatopoetischer Zellen gefunden werden kann, wie auch auf eosinophilen Granulozyten. Die Expression von CD69 auf Eosinophilen wird durch GM-CSF, Interleukin-3 und -5 sowie Interferon- γ induziert. Dies verdeutlicht, dass CD69 ein Marker der Eosinophilen Aktivierung ist. (Matsumoto et al. 1998) Aktivierte Eosinophile im Tumorbett degranulieren bei Kontakt mit nekrotischen Arealen und setzen ihre zytotoxischen Granulaproteine frei. Zusätzlich zu dieser effektiven Antitumor Reaktion, sezernieren aktivierte Eosinophile verschiedene Chemokine, die CD8+ T-Zellen anlocken. (Carretero et al. 2015) Somit ist es essenziell, den Aktivitätsstatus von eosinophilen Granulozyten anhand des Oberflächenmarkers CD69 zu determinieren.

Auch für dieses Oberflächenprotein wurden die Schnitte immunhistochemisch angefärbt und gefärbte Zellen ausgezählt. Unterschieden wurde zwischen einer intratumoralen und einer peritumoralen Lokalisation. Die Schnitte stammen von Patientenproben aus melanozytären Naevi (NZN), primären Malignen Melanom, welche in metastasiertes (MM met) und nicht metastasiertes (MM non-met) unterteilt wurden, sowie von Metastasen (Met reg./dist.).

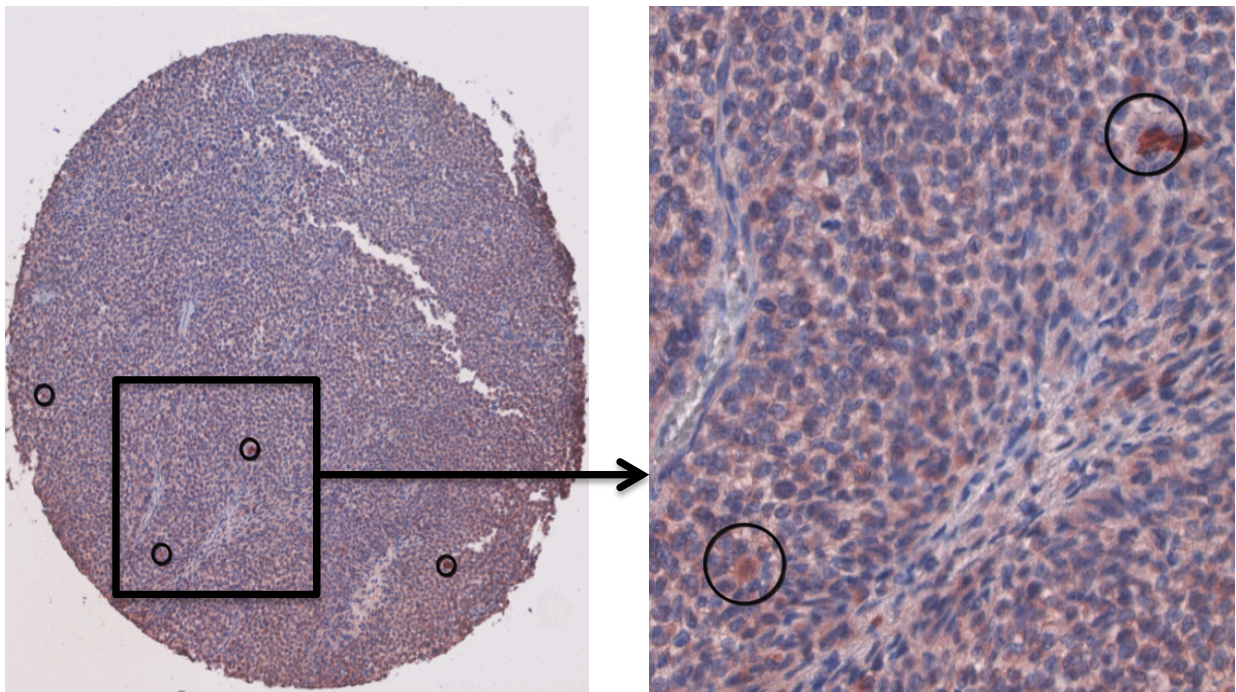


Abbildung 10 Analyse eines CD69+ eingefärbten Gewebeschnitts einer Lymphknotenmetastase von TMA2 mit NPD.view2 (Vergrößerung: Links 5x; Rechts 20x)

3.3.1 Intratumorale Expression

Anhand des Oneway-ANOVA Tests wurde die Anzahl der ausgezählten CD69+, intratumoralen Eosinophilen der Gewebeschnitte miteinander verglichen. Wiederum zeigt sich eine signifikante Differenz zwischen der Anzahl der Eosinophilen in NZN-Schnitten verglichen mit nicht-metastasierten Melanomschnitten ($p=0,013$). Außerdem demonstrieren wir ein höchstsignifikantes Ergebnis des Vergleichs von intratumoralen CD69+ Zellen in metastasierten und nicht metastasierten Melanomschnitten ($p<0,0001$). In Schnitten von nicht metastasierten Melanomen zeigt sich die höchste Anzahl positiver Zellen. Dies wird in Abbildung 11 grafisch dargestellt.

Von der Auswertung der peritumoral gezählten Zellen wird hier erneut abgesehen, da ebenfalls eine zu geringe Anzahl an eingefärbten CD69+ eosinophilen Granulozyten peritumoral lokalisiert wurde. Eine Auswertung einer so geringen Zahl wäre nicht von statistischer Relevanz.

Der Kruskal-Wallis Test überprüft, ob zwei unabhängig entnommene Proben den gleichen Ursprung haben. In dieser Studie bedeutet dies, dass getestet wird, ob zwei Proben desselben Patienten gleich sind. In der Pärchenanalyse von CD69 gefärbten Schnitten zeigt sich ein höchstsignifikanter Unterschied ($p=0,0002$) der verglichenen Proben derselben Patienten.

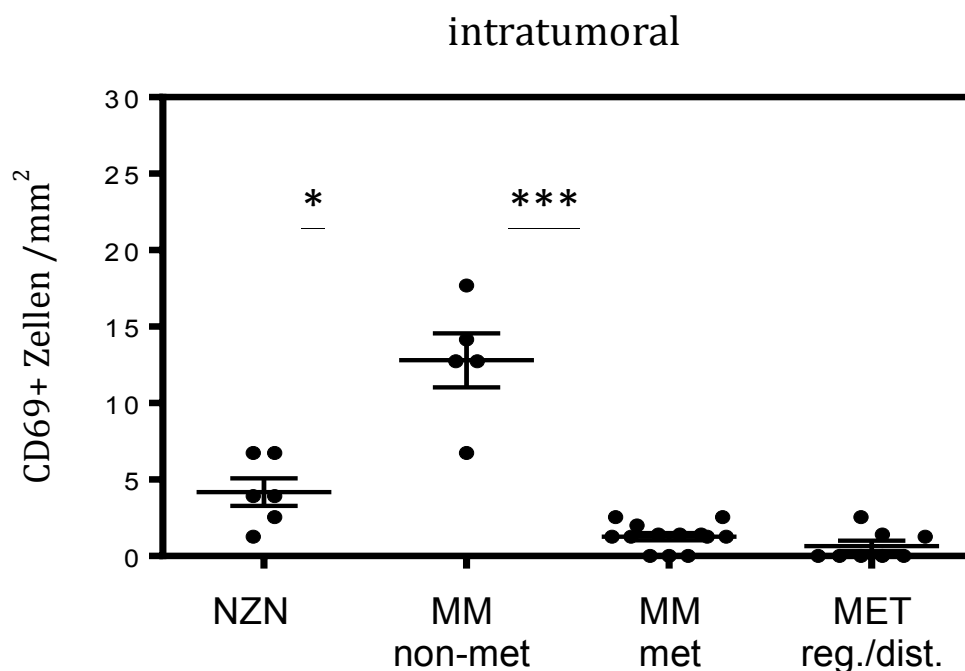


Abbildung 11 CD69+ Zellen intratumoral (NZN = melanozytäre Naevi; MM non-met = nicht metastasiertes Primärmelanom; MM met = metastasiertes Primärmelanom; MET reg./dist. = lokoregionale Metastasen und Fernmetastasen)

3.4 Marker CD44

CD44 ist ein Oberflächenprotein auf hämatopoetischen Zellen, das nicht eosinophilen spezifisch ist. Es kann auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen, wie B-Zellen, T-Zellen und eosinophilen Granulozyten, gefunden werden. Eine vermehrte Expression von CD44 deutet auf eine Zellaktivierung hin. Jedoch wird CD44 auch im nicht aktivierten Zustand exprimiert und erfährt bei Aktivierung lediglich eine vermehrte Expression. Die Aktivierung von Eosinophilen ist essentiell für eine effektive Tumorimmunabwehr. (Bochner 2000)

Hier wurden die CD44+ eosinophilen Granulozyten auf histologischen Schnitten ausgezählt sowie in intra- und peritumoral unterschieden. Die Schnitte stammen von Nävuszellnaevi (NZN), metastasierten und nicht metastasierten Primärmelanomen (MM met und MM non-met) sowie Metastasen. Die Metastasen werden wiederum in regionale (MET loco-reg) und Fernmetastasen (MET distant) unterteilt.

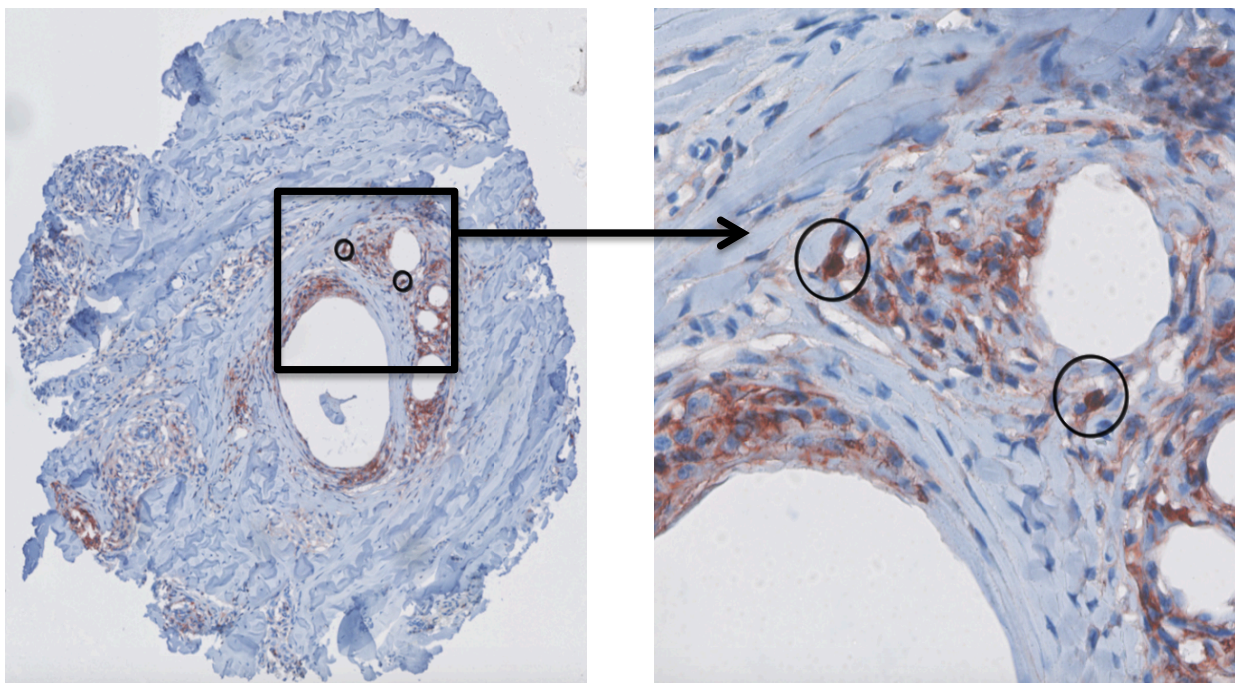


Abbildung 13 Analyse eines CD44+ eingefärbten Gewebeschnitts einer Hautmetastase von TMA2 mit NPd.view2 (Vergrößerung: Links 5x; Rechts 20x)

3.4.1 Intratumorale Expression

Mittels des Oneway-ANOVA Tests analysierten wir die positiven intratumoralen, CD44+ Eosinophilen in Bezug auf ihr Vorkommen in NZN, Primärmelanomen und Metastasen. Es zeigt sich eine signifikante Differenz zwischen der Anzahl an positiven Zellen in nicht metastasierten Melanomen und regionalen Metastasen ($p=0,0278$). Außerdem besteht eine Signifikanz in dem Vergleich von metastasiertem Primärmelanom und regionalen Metastasen ($p=0,0304$). Im Kontrast zu den anderen untersuchten Oberflächenmarkern können wir hier keine signifikante Differenz

Des Weiteren untersuchten wir eine mögliche Korrelation zwischen der Anzahl an CD44+ Eosinophilen und dem T-Stadium sowie dem Breslow Index und dem Vorkommen von Ulzeration. Wir können für diese Analysen kein signifikantes Ergebnis präsentieren.

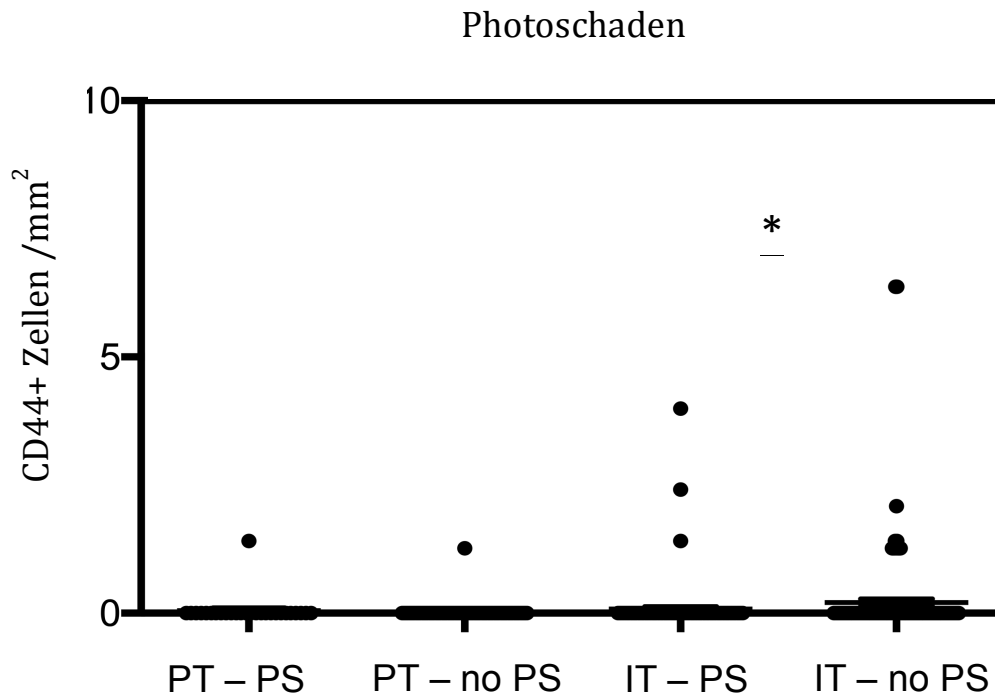


Abbildung 15 CD44+ Zellen in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden (PT-PS = peritumorale Zellen auf Gewebeschnitten mit Photoschaden; PT-no PS = peritumorale Zellen auf Gewebeschnitten ohne Photoschaden; IT-PS = intratumorale Zellen auf Gewebeschnitten mit Photoschaden; IT-no PS = intratumorale Zellen auf Gewebeschnitten ohne Photoschaden)

3.5 Marker ECP

ECP ist ein in den eosinophilen Granula lokalisiertes kationisches Protein. Es wird gemeinsam mit anderen Granulaproteinen bei Degranulation der Eosinophilen freigesetzt und besitzt zytotoxische Aktivität. Der zytotoxische Antitumor Effekt, der bei eosinophilen Granulozyten beobachtet werden kann, wird vorrangig durch ihre zyotoxischen Granulaproteine ausgelöst. ECP verfügt über die Eigenschaft, eine osmotische Lyse von Zellen herbeizuführen und diese somit zu eliminieren. Die Degranulation von Eosinophilen erfolgt bei Aktivierung der Zelle durch Stimuli wie beispielsweise Zytokine. (Pereira et al. 2011; Zrinski et al. 2011)

In diesem Studienkonzept wurden eosinophile Granulozyten, die mit ECP Antikörper eingefärbt waren, per Lichtmikroskop ausgezählt. Die Lokalisation der Zellen wurde ebenfalls in intratumoral und peritumoral unterschieden. Es erfolgte eine Auswertung mittels Unterteilung der Schnitte bezüglich ihres ursprünglichen Gewebes. Hier differenzieren wir zwischen Nävuszellnaevi (NZN), metastasierten und nicht metastasierten Primärmelanomen (MM met und MM non-met) sowie regionalen Metastasen (MET loco-reg) und Fernmetastasen (MET distant).

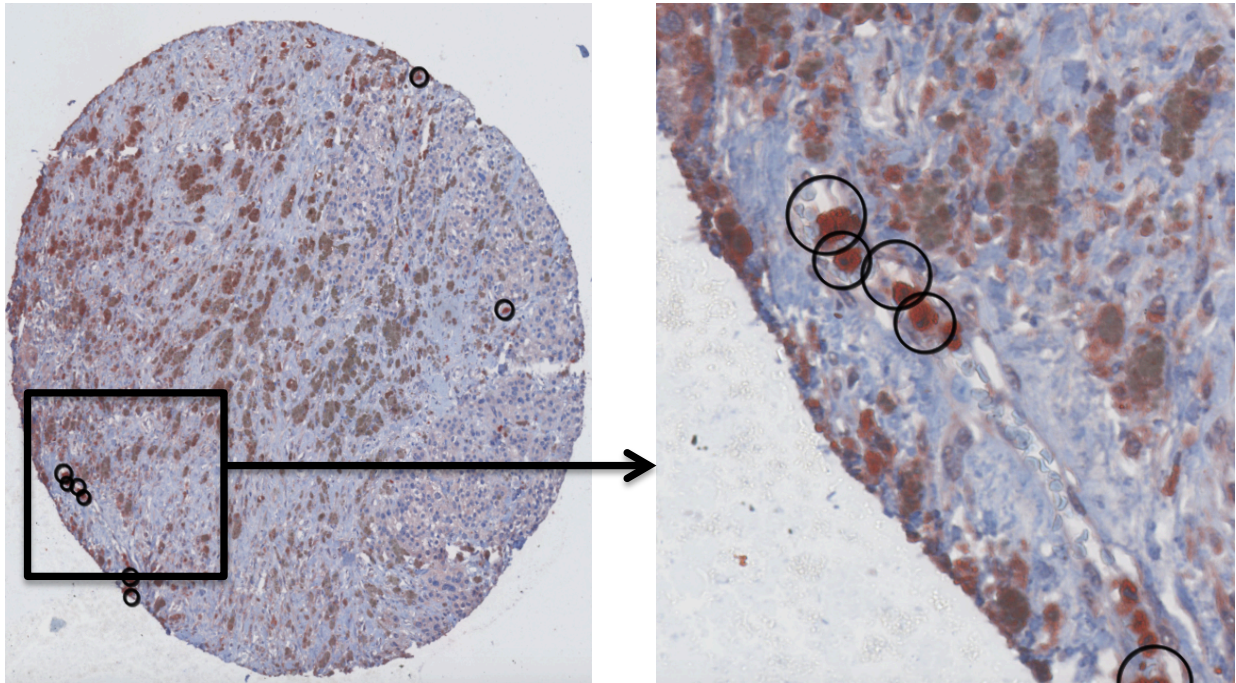


Abbildung 16 Analyse eines ECP+ eingefärbten Gewebeschnitts eines Primärmelanoms von TMA2 mit NPD.view2 (Vergrößerung: Links 5x; Rechts 20x)

3.5.1 Intratumorale Expression

Der Oneway-ANOVA Test ermöglicht einen Gruppenvergleich. So wurden Schnitte der NZN den nicht metastasierten Melanomschnitten gegenübergestellt sowie die nicht metastasierten den metastasierten Melanomschnitten usw. Diese beiden Gegenüberstellungen zeigen signifikante Ergebnisse. Wir zeigen, dass ein signifikanter Unterschied von intratumoralen ECP+ Eosinophilen zwischen NZN Schnitten sowie nicht metastasierten Melanomschnitten besteht ($p=0,013$). Außerdem besteht eine höchstsignifikante Differenz von intratumoralen, positiven Zellen zwischen nicht metastasierten und metastasierten Melanomschnitten ($p<0,0001$). Dies ist in Abbildung 17 dargestellt. Die größte Anzahl an ausgezählten, positiven Immunzellen befindet sich auf nicht metastasierten Melanomschnitten.

In der Auszählung der peritumoralen Zellen ergab sich aufgrund des prozentual sehr geringen Anteils an peritumoralem Gewebe eine sehr geringe Anzahl an positiven Zellen. Folglich wird von einer Auswertung abgesehen, da mit einer sehr geringen Anzahl an angetroffener, positiver Eosinophilen keine statistische Aussagekraft besteht.

Der Kruskal-Wallis Test dient zur Gegenüberstellung von Proben desselben Patienten. Diese Pärchenanalyse zeigte ebenfalls ein hochsignifikantes Ergebnis in der intratumoralen Auswertung ($p=0,0002$). Dies bestätigt eine Ungleichheit der Gewebeproben desselben Patienten.

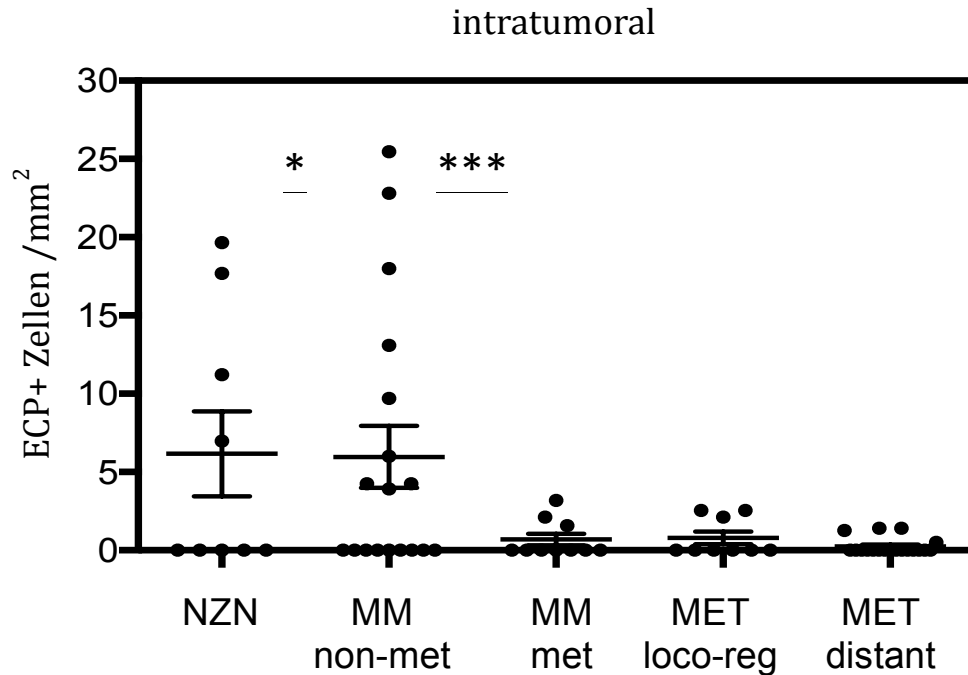


Abbildung 17 ECP+ Zellen intratumoral (NZN = melanozytäre Naevi; MM non-met = nicht metastasiertes Primärmelanom; MM met = metastasiertes Primärmelanom; MET loco-reg = lokoregionale Metastasen; MET distant = Fernmetastasen)

3.5.2 Expression in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden

Weiterhin wurden die Daten bezüglich eines Zusammenhangs mit UV-Schäden (Photoschaden) analysiert. Mittels des Oneway-ANOVA Tests zeigt sich eine hochsignifikante Differenz zwischen intratumoralen ECP+ Zellen von Gewebeschnitten mit Photoschaden und ohne Photoschaden ($p=0,0012$). Zusätzlich weisen wir einen signifikanten Unterschied zwischen positiven peritumoralen Zellen von Schnitten mit UV-Schaden sowie ohne UV-Schaden vor ($p=0,035$).

Außerdem führten wir eine Analyse von T-Stadium in Bezug auf die Anzahl von ECP+ Eosinophilen durch. Diese Ergebnisse sind nicht signifikant. Weiterhin zeigt sich keine Korrelation von positiven Zellen und Breslow Index sowie Ulzeration. Auch hier sind die Ergebnisse nicht signifikant.

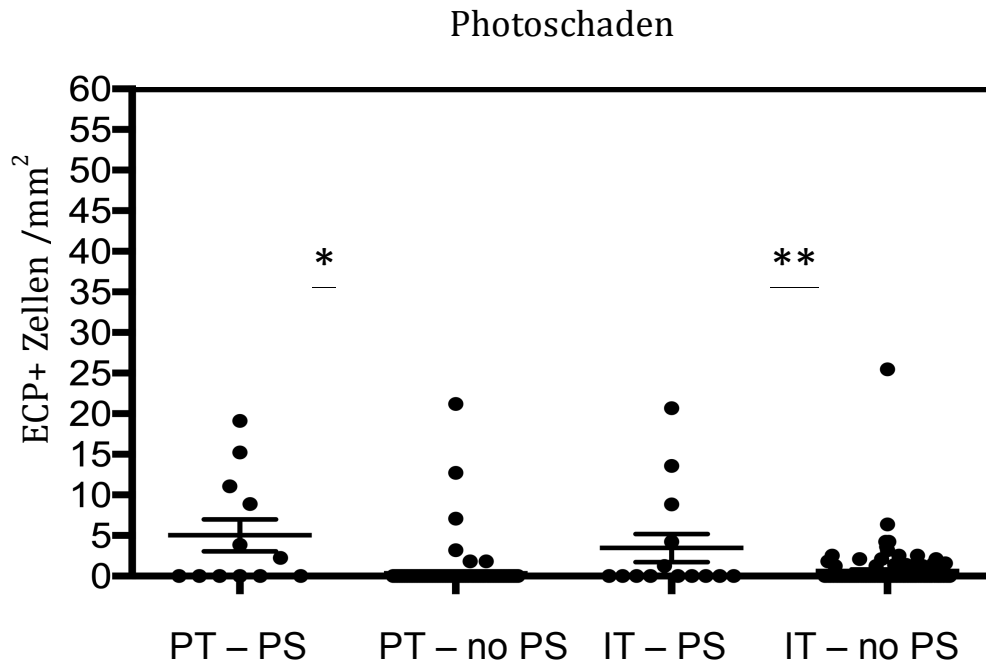


Abbildung 18 ECP+ Zellen in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden (PT-PS = peritumorale Zellen auf Gewebeschnitten mit Photoschaden; PT-no PS = peritumorale Zellen auf Gewebeschnitten ohne Photoschaden; IT-PS = intratumorale Zellen auf Gewebeschnitten mit Photoschaden; IT-no PS = intratumorale Zellen auf Gewebeschnitten ohne Photoschaden)

3.6 Marker EPX

Wie auch ECP ist das Protein EPX in den Granula der eosinophilen Granulozyten lokalisiert. Es gehört zur Familie der Oxireduktasen und wird primär bei Zeichen einer Infektion in das Gewebe sezerniert. EPX besitzt die Fähigkeit reaktive Sauerstoffspezies zu bilden, welche dem umliegenden Gewebe schaden. So unterstützt es die körpereigene Abwehrreaktion, wie auch die Antitumorabwehr. (Acharya & Ackerman, 2014; Ackerman, 2013)

So wie die anderen Proteine, wurden EPX+ gefärbte Zellen einzeln ausgezählt und eine intratumorale und peritumorale Lokalisation unterschieden. Darauf folgte ein Vergleich von Schnitten von Naevuszellnaevi (NZN), metastasierten und nicht metastasierten Primärmelanomen (MM met und MM non-met) sowie regionale Metastasen (MET loco-reg) und Fernmetastasen (MET distant).

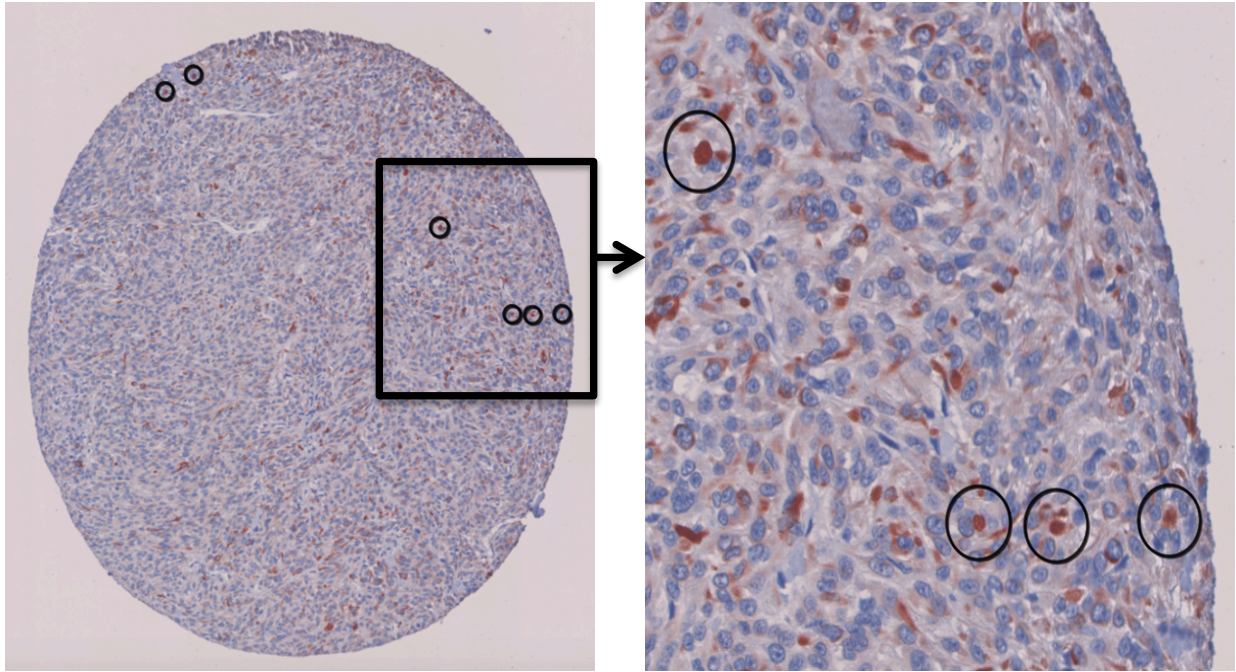


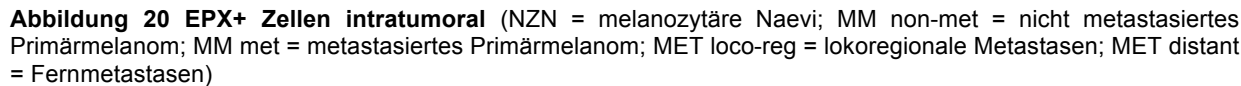
Abbildung 19 Analyse eines EPX+ eingefärbten Gewebeschnitts einer Hautmetastase von TMA2 mit NPD.view2 (Vergrößerung: Links 5x; Rechts 20x)

3.6.1 Intratumorale Expression

Mittels des Oneway-ANOVA Test kann ein Vergleich der verschiedenen Ursprünge der Gewebeschnitte durchgeführt werden. Wir demonstrieren ein hochsignifikantes Ergebnis der intratumoralen, EPX+ Eosinophilen zwischen den Nävuszellnaevischnitten und den nicht metastasierten Melanomschnitten ($p=0,0061$). Außerdem besteht eine höchstsignifikante Differenz zwischen der Anzahl an positiven Zellen auf nicht metastasierten und metastasierten Melanomschnitten ($p<0,0001$). Dies zeigt sich in Abbildung 20. Die meisten EPX+ Eosinophilen sind auf Schnitten von nicht metastasierten Melanomen zu finden.

Von einer statistischen Auswertung der ausgezählten, peritumoralen Zellen wurde abgesehen, da wiederum eine zu geringe Anzahl besteht. Aufgrund des geringen Anteils peritumoralen Gewebes an den Gewebeschnitten, ergibt sich eine zu geringe Anzahl EPX+ peritumoraler Zellen für eine statistisch relevante Analyse.

Des Weiteren wurde der Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Dieser Test zeigte ebenfalls ein signifikantes Ergebnis ($p=0,0003$), was verdeutlicht, dass Proben desselben Patienten unterschiedlich sind.



Es folgte eine Analyse des Effekts von UV-Schädigung (Photoschaden) des Gewebes auf die Präsenz von eosinophilen Granulozyten. Hier zeigt sich eine hochsignifikante Differenz von intratumoralen EPX+ Zellen in Gewebe mit Lichtschaden und in Gewebe ohne Lichtschaden ($p=0,00378$). Zusätzlich zeigt sich ein signifikantes Ergebnis im Vergleich von peritumoralen Zellen in UV geschädigtem Gewebe und Gewebe ohne UV-Schädigung ($p=0,0349$). In Abbildung 21 wird dieses Ergebnis grafisch dargestellt. Erneut suchten wir nach einer Korrelation zwischen der Anzahl an positiven Immunzellen und T-Stadium. Hier ist das Ergebnis nicht signifikant. Eine Analyse von positiven Zellen und Breslow Index zeigt sich ebenfalls nicht signifikant. Ebenfalls kann keine Korrelation zwischen positiven Immunzellen und Ulzeration festgestellt werden.

Photoschaden

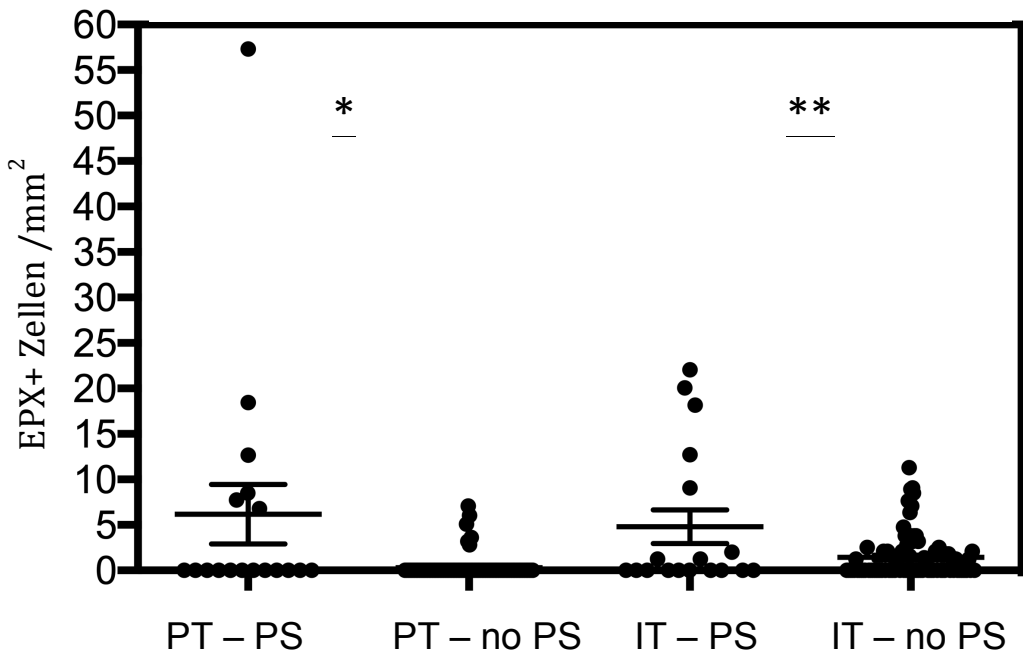


Abbildung 21 EPX+ Zellen in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden (PT-PS = peritumorale Zellen auf Gewebeschnitten mit Photoschaden; PT-no PS = peritumorale Zellen auf Gewebeschnitten ohne Photoschaden; IT-PS = intratumorale Zellen auf Gewebeschnitten mit Photoschaden; IT-no PS = intratumorale Zellen auf Gewebeschnitten ohne Photoschaden)

4 DISKUSSION

Analysen der Tumormikroumgebung haben in den letzten Jahren das Verständnis von Tumorwachstum und -progress entscheidend verändert. Diese Studie kam zustande mit dem Ziel, die Ergebnisse der vorherigen Studie von Dr. med. dent. Anna Hufeland weiterzuführen (Hufeland et al. 2015). In dieser Studie wurde gezeigt, dass Siglec 8-exprimierende (Siglec8+) eosinophile Granulozyten vermehrt in Primärmelanomen mit guter Prognose zu finden sind.

In dieser Arbeit wurden neben CD8+ Effektor-T-Lymphozyten Aktivitätsmarker der eosinophilen Granulozyten wie CD69, CD44 und ECP sowie EPX untersucht. Die Expressionsanalysen wurden in gutartigen melanozytäre Naevi, Primärmelanomen und in Melanometastasen jeweils ein und desselben Patienten durchgeführt. Die Auswahl der Aktivitätsmarker erfolgte anhand einer Literaturrecherche sowie anhand einer globalen Expressionsanalyse eosinophiler Granulozyten, die einem Polarisationsassay unterzogen wurden, mit dem Ziel die Aktivität von Eosinophilen in der Tumorumgebung des malignen Melanoms besser zu verstehen und geeignete prognostische Biomarker zu identifizieren.

4.1 Forschungsstand

Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, kann das Vorhandensein intratumoraler eosinophiler Granulozyten ein wichtiger prognostischer Marker des Malignen Melanoms sein. Um die Qualität dieses Biomarkers und seine mechanistische Bedeutung besser einordnen zu können, sollten die bereits bestehenden Prognosemarker zum Vergleich herangezogen werden.

Die aktuelle S3-Leitlinie zum Malignen Melanom bezieht sich auf die 8. Fassung der AJCC Klassifikation (AWMF S3 Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Onkologie Leitlinienprogramm, 2019). Diese beinhaltet die TNM Klassifikation mit Einbindung von Tumordicke und Ulzeration. (Gershenwald et al. 2017) Der Breslow Index, d.h. die vertikale Tumordicke, beschreibt die maximale vertikale Ausdehnung des Tumors und gilt als einer der wichtigsten unabhängigen, prognostischen Marker des Melanoms. (Balch et al. 2001; Breslow 1970) Auch eine Ulzeration des Primärtumors stellt einen negativen, prognostischen Faktor dar. (Balch et al. 2009; Bonnelykke-Behrndtz et al. 2014) Die Ulzeration eines Tumors ist definiert als Abwesenheit der Epidermis oberhalb der Tumorzellen. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Ulzerationen erhöht sich mit steigender Tumordicke. Des Weiteren kommt der Mitoserate eine wichtige prognostische Bedeutung zu. Sie repräsentiert die Tumorphiliferation und korreliert somit gegensätzlich mit Prognose und Überleben der Patienten, ist aber nicht mehr Teil der aktuellen Tumorklassifikation (Balch et al. 2009; Gershenwald et al. 2017; Kesmodel et al. 2005; Schmid-Wendtner et al. 2001)

Ein weiterer wichtiger Parameter, der Teil der AJCC Klassifikation ist, ist der Lymphknotenstatus. Als Sentinal Node bezeichnet man den sogenannten ‚Wächterlymphknoten‘, den ersten Lymphknoten der Lymphabflussbahn eines Primärtumors. Die aktuelle Leitlinie empfiehlt eine Wächterlymphknoten-Biopsie ab einer Tumordicke von 1,0mm, bei bestehenden Risikofaktoren auch schon bei dünneren Primärtumoren, durchzuführen. Eine Metastasierung im Wächterlymphknoten ist mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert, die

mit der Ausdehnung der Tumorlast und Lage der Metastasen im Lymphknoten korreliert. (Onkologie Leitlinienprogramm 2019)

Als Surrogat-Marker für den Mitoseindex wurden eine Reihe Proliferationsmarker, wie beispielsweise Ki-67 und pHH3 identifiziert, diese sind jedoch nicht Teil der (dermato-) histopathologischen Routine-Testung. Antigen Ki-67 ist ein Marker, der seit längerem in der Diskussion steht. Ki-67 wird durch das Gen MKi67 kodiert und spielt eine essentielle Rolle in zellulärer Proliferation. Das Protein ist während allen aktiven Phasen des Zellzyklus nachweisbar, folglich während der G1, G2 und S-Phase sowie während der Mitose. Ki-67 ist während der G0 Phase einer Zelle nicht detektierbar. Folglich ist es ein genauer Marker für Zellproliferation. (Bullwinkel et al. 2006; Li et al. 2002; Scholzen and Gerdes 2000; Schonk et al. 1989) Ki-67 ermöglicht eine gute Differenzierung zwischen benignen und malignen melanozytären Läsionen. (Ohsie et al. 2008) Des Weiteren scheint das Protein eine prognostische Aussagekraft für das Maligne Melanom zu besitzen. Verschiedene Studien konnten Ki-67 als unabhängigen, prognostischen Marker für eine verschlechterte Prognose definieren. (Korabiowska et al. 2000; Ostmeier et al. 2001) Andere Studien bestätigten zwar die Assoziation von einem erhöhten Ki-67 Index mit einer negativen Prognose, jedoch konnte die Unabhängigkeit des Markers nicht repliziert werden. Es wurde gezeigt, dass ein hoher proliferativer Index mit einem verschlechterten klinischen Ausgang assoziiert ist, jedoch ebenfalls mit einer erhöhten Tumordicke sowie Ulzeration und Nekrose vergesellschaftet ist. (Frahm et al. 2001; Hazan et al. 2002; Ladstein et al. 2010) Eine größere Tumordicke sowie das Vorhandensein von Ulzerationen sind bereits als negative, prognostische Faktoren etabliert. Es lässt sich nicht klar differenzieren, ob der beobachtete Effekt durch einen erhöhten Ki-67 Index oder durch eine vergrößerte Tumordicke beziehungsweise durch Ulzeration bedingt ist.

Ein weiterer Prognosemarker des Malignen Melanoms ist der Mitosemarker pHH3 (Ser10). Es handelt sich um das phosphorylierte Histon H3, welches 1997 als Mitosemarker eingeführt wurde. Die Phosphorylierung von Histon H3 präsentiert sich ausschließlich während der späten G2 Phase sowie während der Mitose. (Hendzel et al. 1997) Dies unterscheidet sich von dem oben genannten Mitosemarker Ki-67, der in allen Phasen des Zellzyklus gefunden werden kann.

pHH3 kann immunhistochemisch angefärbt werden, um Mitosen sichtbar zu machen. Mehrere Studien demonstrierten, dass die Genauigkeit der Ermittlung der Mitoserate durch pHH3 Färbungen gleichwertig gegenüber einer Ermittlung der Mitoserate per HE Färbung ist. Der Vorteil der pHH3 Färbung gegenüber der konventionellen Methode ist die Schnelligkeit, die dieses Verfahren erlaubt. Die Zeit zur Evaluation eines Zellverbandes ist durchschnittlich 63% schneller mit der neuen Methode im Vergleich zur standardisierten Ermittlung per HE Färbung. (Casper et al. 2010; Ikenberg et al. 2012)

Die Nutzung von pHH3 zum Grading von Hirntumoren konnte sich schnell durchsetzen. Außerdem wurde es als stärkster prognostischer Marker in Brustkrebspatienten etabliert. (Kim et al. 2007; Ribalta et al. 2004; Skaland et al. 2007; Takei et al. 2007)

In der Histopathologie des Malignen Melanoms wurde es zunächst genutzt um Melanome von melanozytären Naevi zu unterscheiden. In benignen Läsionen zeigt sich ein deutlich geringerer Mitoseindex im Vergleich zu malignen Hautveränderungen. Es wurde deutlich, dass pHH3 die sensitivste Methode ist, um die Mitoseaktivität eines Melanoms mit geringer Tumordicke zu ermitteln. (Nasr and El-Zammar 2008; Schimming et al. 2012)

Prognostisch ist pHH3 ein Marker, der wie Ki-67 und Mitoseindex, auf einen aggressiveren Tumor und somit eine schlechtere Prognose hindeutet. Analysen zeigten, dass eine signifikante Korrelation zwischen erhöhtem pHH3 und einem verkürzten progressionsfreiem Überleben beim Malignen Melanom besteht. Die Datenlage bezüglich prognostischer Überlegenheit gegenüber Ki-67 oder Mitoseindex ist widersprüchlich. Aus der bestehenden Datenlage können keine eindeutigen Schlüsse zu den Vorteilen von pHH3 gegenüber Ki-67 gezogen werden. (Hale et al. 2013; Ladstein et al. 2010, 2012; Nielsen et al. 2013; Tetzlaff et al., 2013)

Deutlich ist, dass Ki-67 sowie pHH3 und der Mitoseindex wichtige prognostische Marker des Malignen Melanoms sind, da sie ein aggressiveres Tumorwachstum quantifizieren und daher mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Sie sind jedoch bisher nicht als unabhängige, prognostische Marker etabliert und zählen nicht in die dermatologische Routinetestung bei Malignem Melanom.

Weitere Proteine, die als prognostische bzw. prädiktive Biomarker dienlich sein könnten, sind in den letzten Jahren in das Zentrum der Tumorforschung gerückt, wie PD1 und PD-L1. Programmed-death receptor-1 (PD-1) wurde erstmalig 1992 beschrieben und ist ein Transmembran-Rezeptor mit der Funktion eines negativen Immuncheckpoints, insbesondere auf T-Zellen, der an seinen Counter-Rezeptor PD-L1 bindet. (Ishida et al. 1992) Programmed death-ligand 1 ist ebenfalls als CD274 oder B7-H1 bekannt. Eine PD1/PD-L1 Aktivierung bewirkt eine Stimulation inhibitorischer Signalwege in der Zelle. Zu finden ist dieser Rezeptor vor allem auf Immunzellen, wie T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen. Der PD1/PD-L1 Signalweg bewirkt eine Inaktivierung der T-Zell-Funktion. Physiologisch ermöglicht dieser Mechanismus eine T-Zell Toleranz und reguliert die T-Zell Aktivität. Dadurch ist der Organismus durch überaktive T-Zellen geschützt, beispielsweise im Falle einer mikrobiellen Infektion. (Greenwald et al. 2005; Herbst et al. 2014; Okazaki et al. 2006)

PD1/PD-L1 reguliert nicht nur die T-Zell-Antwort auf Infektion sondern auch auf Tumorwachstum. Die Expression von PD-L1 kann dazu führen, dass die Immunantwort auf Tumorwachstum sehr schwach ausfällt und der Tumor der körpereigenen Tumorummunantwort entgeht. (Iwai et al. 2002) PD-L1 Expression konnte bereits in vielen Tumorentitäten nachgewiesen werden und ist immer mit einer schlechteren Prognose assoziiert; beispielsweise in Brustkrebs (Ghebeh et al. 2006), in Pankreastumoren (Nomi et al. 2007), in Ösophaguskarzinomen (Ohigashi et al. 2005) und in Magenkarzinomen (Tamura et al. 2015).

Auch in Melanomzellen wurde PD-L1 Expression gefunden und ist hier ebenfalls mit einer vermehrten Tumoraggressivität und Progression assoziiert. (Kraft et al. 2017; Yang et al. 2008)

Aus diesen Forschungsergebnissen ergab sich ein neuer Therapieansatz: PD1/PD-L1 Inhibitoren, sogenannte Immuncheckpoint-Inhibitoren. Diese verhindern die Inaktivierung der T-Zellen und verstärken so die körpereigene Antitumor-Immunantwort. Mit dieser Therapie konnten bereits hohe Remissionsraten und langanhaltendes Ansprechen beim Malignen Melanom erzielt werden. (Patel et al. 2015) Dennoch reagieren 30-50% der Patienten nicht wie erwartet auf die neue Immuntherapie. Eine Überexpression des Tumors von PD-L1 ist ein wichtiger prädiktiver Faktor für das Ansprechen der PD1/PD-L1 Inhibitoren, jedoch ist die Färbung von PD-L1 oft nicht akkurat. Die Standardisierung der Bestimmung der Expressionsrate von PD-L1 ist komplex und vom eingesetzten Wirkstoff abhängig, wie beispielsweise beim NSCLC, sodass eine einheitliche Beurteilung noch nicht möglich ist. (Meng et al. 2015; Patel et al. 2015) Viele Studien zeigen Daten, die suggerieren,

dass Tumorpatienten mit einer hohen PD-L1 Expression das beste Ansprechen auf PD1/PD-L1 Inhibitoren zeigen, was wiederum die Prognose dieser Patienten verbessert. (Herbst et al. 2014; Taube et al. 2014) Konträr dazu sprechen auch Patienten mit geringer PDL-1 Expression auf die Immuntherapie an, sodass eine Anwendung von PD-L1 als prädiktiver Marker beim Malignen Melanom in der Routine bisher nicht stattfindet. (Patel et al. 2015)

Ein weiterer wichtiger Prognosemarker der Onkologie, der auch für das Maligne Melanom relevant ist, sind tumorinfiltrierende T-Lymphozyten (TIL). Das menschliche Immunsystem kann über zwei verschiedene Mechanismen die Tumورprogression beeinflussen. Zum einen können Immunzellen sich entwickelnde Tumorzellen bekämpfen und das Tumورwachstum so aufhalten. Zum anderen kann das Immunsystem die Progression des Tumors und dessen Metastasierung fördern. (Gutkin et al. 2014) Jerome Galon konnte zeigen, dass die Infiltration eines Tumors mit T-Lymphozyten die Prognose des Patienten positiv beeinflusst und einen stärkeren Prädiktor für die Patientenprognose darstellt, als die bisher etablierten Kriterien. Dies wurde zunächst für das Kolorektale Karzinom demonstriert. (Galon et al. 2006, 2007) Im Verlauf konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass TIL mit einem verlängerten progressionsfreien Überleben im Kolorektalen Karzinom assoziiert sind. (Halama et al. 2011; Sanchez-cabo et al. 2005)

Allgemeinhin ergaben Analysen, dass TIL einen positiven Effekt auf die Überlebenszeit bei Tumorerkrankungen haben. (Gooden et al. 2011) Bei bestimmten Tumorentitäten wurde nachgewiesen, dass eine Korrelation zwischen TIL und einer verbesserten Prognose besteht. Dazu zählen das Mammakarzinom (Salgado et al. 2015), das Endometriumkarzinom (Kondratiev 2004), das Urothelkarzinom (Sharma et al. 2007) sowie das Maligne Melanom (Khammari et al. 2014).

Auf Basis dessen entwickelte Galon et al. das Konzept des Immunoscores. Dies beschreibt eine Klassifikation, die die bestehende TNM Klassifikation der Onkologie ergänzen soll. (Galon et al. 2006, 2012, 2013) Anhand der Analyse der Immunzellinfiltration eines Tumors kann eine Prognoseabschätzung getroffen werden, die den tatsächlichen Verlauf eines Patienten besser einschätzen soll als bisher verwendete Kriterien. Galon et al. basiert dies auf der Beobachtung in einer Studie, in der alle Patienten mit Kolorektalem Karzinom R0 reseziert wurden und dennoch sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe zeigten. Diese unterschiedlichen Krankheitsverläufe korrelierten mit dem zusätzlich bestimmten Immunoscore. Galon et al. schloss hieraus, dass der Immunoscore ergänzend zu der bestehenden TNM Klassifikation der Onkologie die Prognose von Tumorerkrankungen besser einordnen kann. (Galon et al. 2012)

Für das Maligne Melanom konnte ebenfalls eine Reihe von Studien zeigen, dass eine erhöhte Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten mit einer verbesserten Prognose einhergeht. TIL ist demnach ein unabhängiger, signifikanter Prognosefaktor für das progressionsfreie Überleben sowie für das Auftreten von Satellitenmetastasen bzw. Befall des Sentinel-Lymphknotens im Malignen Melanom. (Azimi et al. 2012; Clemente et al. 1996; Fortes et al. 2015; Van Houdt et al. 2008; Khammari et al. 2014; Piras et al. 2005)

Carretero et al. konnte in seiner Studie demonstrieren, dass TIL die zusätzliche Infiltration von eosinophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung benötigen, um eine effektive Tumorummunabwehr zu ermöglichen. (Carretero et al. 2015) Bereits in den 80er Jahren fiel die Bedeutung einer Immunzellinfiltration der Tumormikroumgebung mit eosinophilen Granulozyten auf. Zwei bekannte Fallberichte einer Publikation von Reddy et al. (Reddy et al., 1984) beschreiben die Korrelation von

Tumorstadium und tumorassoziierte Eosinophilie. Die Fallberichte beschreiben die Krankengeschichte zweier junger Patientinnen, die die Diagnose eines nodulären, histiozytären Lymphoms sowie eines Zervixkarzinoms gestellt bekamen. Bei einer der Patientinnen fand sich eine Eosinophilie im Blutbild, während bei der anderen Patientin ein eosinophiles Infiltrat der Tumormikroumgebung gefunden wurde. Im Verlauf der Krankengeschichte variierte die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut sowie in der Tumormikroumgebung des Primärtumors und der Metastasen passend zur Tumorstadiumprogression. Zusammenfassend demonstrieren beide Fallberichte, dass eine inverse Korrelation zwischen Tumorstadium und Eosinophilie besteht. Zwei Begriffe lassen sich in diesem Kontext definieren: der Begriff der tumorassoziierten Gewebeeosinophilie (tumor-associated tissue eosinophilia (TATE)) sowie der Begriff der tumorassoziierten Bluteosinophilie (tumor-associated blood eosinophilia (TABE)).

TATE und TABE sind in unterschiedlichen Tumorentitäten zu finden und können gemeinsam oder separat auftreten. TATE scheint mit einer verbesserten Prognose einherzugehen, während TABE häufiger mit Tumorstadium assoziiert zu sein scheint. (Davis et al. 2014; Lowe et al. 1981)

Für das Kolorektale Karzinom konnte bereits durch mehrere Studien etabliert werden, dass ein Immunzellinfiltrat der Tumormikroumgebung mit eosinophilen Granulozyten mit einer verbesserten Prognose assoziiert ist. (Fernández-Aceñero et al. 2000; Harbaum et al. 2015; Prizment et al. 2016) Auch für weitere Tumorentitäten, wie das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, des Larynx oder des Oropharynx sowie das Prostatakarzinom, geht TATE mit einer verbesserten Prognose einher. (Furbert-Harris et al. 2003; Ishibashi et al. 2006; Sahni et al. 2015)

Im Kontrast dazu demonstrierten einige Studien den negativen Effekt von eosinophilen Granulozyten auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Lymphomkrankungen und Leukämie. (Enblad et al. 1993; Utsunomiya et al. 2007; Von Wasielewski et al. 2000) Auch eine experimentelle Studie von da Silva et al. zeigte, dass bei einer Übertragung von Plattenepithelkarzinomzellen auf Wildtyp-Mäuse sowie eosinophilendefiziente Mäuse, das Tumorstadiumwachstum in den Wildtyp-Mäusen verstärkt auftrat im Vergleich zu den Mäusen, die Eosinophilen-depletiert waren. (da Silva et al. 2014)

Simon et al. sowie Varricchi et al. konnten zusammenfassend feststellen, dass eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten der Tumormikroumgebung für die meisten Tumorentitäten wie das Kolorektale Karzinom, Magenkarzinom, Plattenepithelkarzinom des Nasopharynx, Larynx und Ösophagus sowie Mammakarzinom mit einer verbesserten Prognose assoziiert ist. Lediglich für Lymphome, Leukämien und Zervixkarzinome existieren Studien, die eosinophile Granulozyten mit einer schlechten Prognose assoziieren. (Simon et al. 2019; Varricchi et al. 2018)

In ihrem Review zu dieser Thematik suggerieren Davis und Rothenberg, dass eine mögliche Ursache der teilweise widersprüchlichen Studienergebnisse die Studienmethodik sein könnte. Sie bewerten den positiven, prognostischen Wert von eosinophilen Infiltraten in der Tumormikroumgebung als unabhängig von anderen Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, histologisches Grading bzw. Staging des Tumors. (Davis et al. 2014) Varricchi et al. vermutet, dass die Lokalisation der infiltrierenden Eosinophilen von Bedeutung sein könnte. Viele Studien differenzieren nicht zwischen intra- und peritumoraler Immunzellinfiltration, jedoch könnte dies einen entscheidenden Unterschied in der prognostischen Bedeutung zeigen. (Varricchi et al., 2018)

Auch für das Maligne Melanom wurde der Effekt von eosinophilen Granulozyten auf den Verlauf der Tumorerkrankung untersucht. In der Studie von Hufeland et al. wurden Immunzellinfiltrate der Tumormikroumgebung von primären Malignen Melanomen, assoziierten Naevuszellnaevi sowie assoziierten Melanometastasen histologisch analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Anzahl von eosinophilen Granulozyten in der Tumormikroumgebung des Malignen Melanoms mit weniger Metastasierung sowie einem verlängerten Gesamtüberleben einhergeht. Folglich sind eosinophile Granulozyten auch im Malignen Melanom mit einer verbesserten Prognose assoziiert. (Hufeland et al. 2015)

Auch in weiteren Studien wurde der Effekt von eosinophilen Granulozyten auf die Prognose des Malignen Melanoms untersucht. Moreira et al. konnte zeigen, dass eine tumorassoziierte Eosinophilie im Malignen Melanom unabhängig von der Therapie mit einem verlängerten Überleben assoziiert ist. (Moreira et al. 2017) Zusätzlich wurde demonstriert, dass die Degranulation von eosinophilen Granulozyten entscheidend zur Reduktion der Tumormasse im Malignen Melanom beiträgt. (Mattes et al. 2003) Weiterhin wurde deutlich, dass TABE einen positiven Einfluss auf das Ansprechen von Melanompatienten auf Immuntherapien hat. (Simon et al. 2019; Varricchi et al. 2018) Ein Anstieg von eosinophilen Granulozyten im sechswöchigen Zeitraum zwischen Vorthherapie und der zweiten Medikamentengabe zeigte eine Assoziation zu einem verlängerten Überleben in der Therapie von Melanompatienten mit Ipilimumab. (Gebhardt et al. 2015) Auch die Therapie mit Pembrolizumab zeigte ein verbessertes Ansprechen bei Melanompatienten, die erhöhte (vor-therapeutische) Eosinophilenzahlen aufwiesen. (Weide et al. 2016)

Carretero et al untersuchte weitergehend die Mechanismen dieses positiven, prognostischen Effektes von eosinophilen Granulozyten auf die Tumormikroumgebung. In dieser Analyse wurde deutlich, dass eine effektive Tumorummunabwehr nur durch die zeitgleiche Infiltration von eosinophilen Granulozyten und zytotoxischen-CD8-Lymphozyten möglich ist. (Carretero et al., 2015)

Um effektive Tumorabwehr zu leisten, müssen infiltrierende eosinophile Granulozyten der Tumormikroumgebung zusätzlich aktiviert sein. Nur in aktiviertem Zustand können sie Chemokine, wie CCL5, CXCL9 und CXCL10, sezernieren, die CD8+ T-Zellen in die Tumorumgebung locken. Es konnte gezeigt werden, dass bei einem Transfer von T-Zellen gemeinsam mit inaktiven eosinophilen Granulozyten keine effektive Inhibition des Tumorwachstums erzielt werden konnte. Dies betont die Wichtigkeit des aktivierten Zustandes von Eosinophilen in der Tumormikroumgebung. (Carretero et al., 2015)

Die Studie von Lotfi et al zeigt einen Zusammenhang zwischen einer vermehrten eosinophilen Infiltration und nekrotischen Tumorarealen. Es konnte gezeigt werden, dass HMGB1 von nekrotischen Tumorzellen sezerniert wird und als Chemokin eosinophile Granulozyten in die Tumormikroumgebung lockt. (Lotfi et al., 2016)

Eosinophile Granulozyten sind in der Lage im Zusammenspiel mit TIL die Tumormikroumgebung zu verändern. Durch Sekretion verschiedener Botenstoffe können aktivierte Eosinophile eine Normalisierung der Tumolvaskularisation erreichen. Durch die Inhibition der tumorinduzierten Neoangiogenese kann weiteres Tumorwachstum effektiv gehemmt werden. Des Weiteren sind Eosinophile in der Lage die Polarisierung von Makrophagen positiv zu verändern. (Carretero et al., 2015)

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) unterscheiden sich phänotypisch von Makrophagen des gesunden Gewebes. Sogenannte TAMs können durch eine klassische oder eine alternative Aktivierung in unterschiedliche Funktionszustände

gebracht werden. Diese Funktionszustände unterscheiden sich in ihrem Effekt auf die Tumormikroumgebung. Bakterielle Infektionen, Interferon 1 oder 2 fördern die M1 Polarisierung von TAM. Gegenteilig wird durch die alternative Aktivierung durch M-CSF, IL-4 und IL-13 die M2 Polarisierung hervorgerufen. Beide Polarisierungen können ineinander übergehen, sodass ein Kontinuum von Aktivitätszuständen zwischen beiden Polarisierungen besteht. TAM können nicht immer eindeutig einem Polarisierungszustand zugeordnet werden. M1 Makrophagen verfügen über die Fähigkeit das Tumorstadium zu hemmen, indem sie Th1-Leukozyten sowie T-Effektorzellen in das Tumorgewebe locken. Im Gegensatz dazu können M2 Makrophagen das Tumorstadium fördern. Sie unterstützen die Tumorangiogenese und den Gewebeumbau zugunsten des Tumors. (Allavena et al. 2008; Fujimura et al. 2016; Galdiero et al. 2013; Movahedi et al. 2010; Oršolić et al. 2016)

Das Konzept der Polarisierung wurde nicht nur für Makrophagen sondern auch für neutrophile Granulozyten etabliert. Auch für diese Zellen konnte gezeigt werden, dass durch bestimmte Chemokine bzw. Zytokine verschiedene Funktionszustände erreicht werden, die entweder tumorfördernd oder tumorhemmend wirken. (Fridlender et al., 2009; Sagiv et al., 2015)

Die unterschiedlichen Polarisierungen der Zellen, vor allem der Makrophagen, können durch eosinophile Granulozyten beeinflusst werden. Eosinophile verhindern die M2 Polarisierung von TAMs und fördern somit die Vermehrung von M1 Makrophagen in der Tumormikroumgebung. Durch diesen Mechanismus fördern sie zusätzlich den körpereigenen Antitumoreffekt. (Carretero et al. 2015)

Aufgrund des bereits etablierten Konzeptes einer Polarisierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen rückt eine mögliche Polarisierung von eosinophilen Granulozyten in das Zentrum der Forschung. (Varricchi et al. 2018) So wurde die Hypothese formuliert, dass eosinophile Granulozyten ebenfalls einer Polarisierung unterliegen könnten. Dieser Hypothese folgend, wird zwischen einer E1 und E2 Polarisierung unterschieden, die sich mit unterschiedlichen Eigenschaften und Folgen für den Organismus bzw. der Tumorabwehr präsentiert. Während der eine Polarisierungszustand die Tumorummunabwehr fördert, könnte die gegensätzliche Polarisierung das Tumorstadium unterstützen. (Lucarini et al. 2017; Reichman et al. 2016; Sakkal et al. 2016; Varricchi et al. 2018)

Zusammenfassend wird deutlich, dass die aktuell bestehende TNM-Klassifikation der Onkologie die Prognose der meisten Tumorentitäten nicht genau vorhersagen kann und weitere Forschung für unabhängige, prognostische Marker essentiell ist. (Galon et al. 2016) Die etablierte AJCC Klassifikation des Malignen Melanoms beinhaltet zusätzlich zur TNM-Klassifikation die prognostischen Marker vertikale Tumordicke sowie Ulzeration. (Gershenwald et al. 2017) Eine große, vertikale Tumordicke sowie die Ulzeration eines Malignen Melanoms sind negative prognostische Faktoren. Die Wahrscheinlichkeit der Ulzeration eines Tumors wächst jedoch mit steigender Tumordicke, sodass beide Faktoren voneinander abhängig zu sein scheinen. Zusätzlich zu Tumordicke und Ulzeration ist der Lymphknotenstatus des Wächterlymphknotens eines Malignen Melanoms entscheidend für dessen Prognose. Ein Nachweis von Melanomzellen in den Sentinel-Lymphknoten ist ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert. (Balch et al. 2009; Bonnelykke-Behrndtz et al. 2014) Zusätzlich zu diesen bereits etablierten, prognostischen Faktoren sind bisher keine weiteren Prognosemarker für das Maligne Melanom etabliert.

Proliferationsmarker wie Ki-67 und pHH3 sind aktuell kein Teil der histopathologischen Routinetestung in der Analyse von Melanomzellen. Ein hoher Ki-67 Index zeigt sich mit einer negativen Prognose im Malignen Melanom assoziiert, jedoch besteht eine

Korrelation zwischen Ki-67 und einer großen Tumordicke sowie Ulzeration des Tumors. Dies verdeutlicht, dass Ki-67 kein unabhängiger Prognosemarker des Melanoms ist. (Frahm et al. 2001; Hazan et al. 2002; Ladstein et al. 2012) Der Mitosemarker pHH3 dient bereits zur histologischen Unterscheidung von benignen und malignen dermatologischen Läsionen. Die histologische Bestimmung von pHH3 ist die bisher sensitivste Methode der Bestimmung der Mitoseaktivität eines Malignen Melanoms mit nur geringer Tumordicke. (Nasr et al. 2008; Schimming et al. 2012) Beide Proliferationsmarker sind mit einem aggressiverem Tumorwachstum im Malignen Melanom assoziiert, jedoch liegen aktuell keine Daten vor, die sie als unabhängigen Prognosemarker bestätigen.

Weitere Marker, die in der Forschung zu Malignem Melanom beschrieben wurden, sind die Proteine PD1 bzw. PD-L1. Eine hohe Expression dieser Proteine führt zu einer schwächeren Anti-Tumorimmunantwort. Eine vermehrte PD-L1 Expression scheint somit mit vermehrter Tumorprogression assoziiert zu sein. (Kraft et al. 2017; Yang et al. 2008) PD1 bzw. PD-L1 scheinen keine prädiktiven Marker des Melanoms zu sein, jedoch konnte auf Basis der Forschungserkenntnisse ein neuer Therapieansatz mit Immuncheckpoint-Inhibitoren entwickelt werden.

Wie bereits beschrieben, rückt die Immunzellforschung der Tumormikroumgebung immer weiter in das Zentrum der Forschung. Der positive Effekt von Tumorinfiltrierenden-T-Lymphozyten (TIL) ist bereits für viele Tumorentitäten etabliert. Auch für das Maligne Melanom konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Anzahl an TIL in der Tumormikroumgebung einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben von Melanompatienten sowie einen hemmenden Einfluss auf die Metastasierung des Tumors zeigt. (Azimi et al. 2012; Clemente et al. 1996; Fortes et al. 2015; Van Houdt et al. 2008; Khammari et al. 2014; Ladányi 2015; Piras et al. 2005) Zusätzlich wurde der positive Effekt von eosinophilen Granulozyten in der Tumormikroumgebung auf die Prognose von Melanompatienten etabliert. (Carretero et al. 2015; Davis et al. 2014; Hufeland et al. 2015; Moreira et al. 2017; Simon et al. 2019; Varricchi et al. 2018) Carretero et al. verdeutlichte, dass eine gemeinsame Infiltration der Tumormikroumgebung von eosinophilen Granulozyten zusammen mit Zytotoxischen-T-Lymphozyten entscheidend für eine effektive Tumorimmunabwehr ist. (Carretero et al. 2015) Des Weiteren ist der Aktivierungszustand von Eosinophilen von entscheidender Bedeutung. Es gilt, die Mechanismen der Tumorimmunabwehr durch eosinophile Granulozyten und CD8+-T-Lymphozyten genauer zu untersuchen und sie als unabhängige, positive prognostische Marker in der Klassifikation des Malignen Melanoms zu etablieren.

4.2 Einordnung eigener Ergebnisse

Eosinophile Granulozyten scheinen von zentraler Bedeutung in einer effektiven Tumorummunabwehr zu sein. Jedoch ist bedeutsam, dass nur aktivierte Eosinophile einen positiven Effekt auf die Tumorummunabwehr zu haben scheinen. Eosinophile müssen demnach aktiviert sein, um Chemokine zu produzieren, die wiederum CD8⁺ Effektor-T-Zellen in die Tumormikroumgebung locken. Des Weiteren ist ein gewisser Aktivierungszustand nötig, um die Normalisierung der Vaskularisation zu begünstigen und die M1 Polarisierung von Makrophagen zu fördern.

Basierend auf der Hypothese eosinophiler Polarisierung und globalen Expressionsanalysen polarisierter Eosinophiler (Arbeitsgruppe Günter Hämmerling, persönliche Kommunikation) wurden in Vorbereitung für diese Studie die folgenden Proteine zur Analyse auf eosinophilen Granulozyten ausgewählt: CD69, CD44, ECP und EPX. Ziel ist, eine Aktivierung der Eosinophilen anhand exprimierter Proteine im Tumorgewebe zu untersuchen und in Korrelation mit dem klinischen Verlauf eventuelle Unterschiede in ihren prognostischen Eigenschaften zu finden.

CD8 ist ein Oberflächenprotein, das vorrangig auf T-Zellen zu finden ist. Wir untersuchten CD8⁺ Effektor-T-Zellen, um deren Kopräsenz mit eosinophilen Granulozyten in der Tumormikroumgebung nachzuweisen. Wir konnten wie erwartet zeigen, dass CD8⁺ Effektor-T-Zellen in Kombination mit einer erhöhten Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Malignen Melanom mit einer verbesserten Prognose assoziiert sind.

Die Oberflächenmarker, die wir auf Eosinophilen untersuchten waren CD69 sowie CD44. Beide sind Rezeptormoleküle auf der Zellmembran, die auf einer Reihe von hämatopoetischen Zellen, wie T-Zellen und B-Zellen, zu finden sind. (Lesley et al. 1993; Ziegler et al. 1993) Sie sind folglich nicht Eosinophilen-spezifisch. CD69 wird bei Aktivierung von Leukozyten exprimiert und scheint proinflammatorische Eigenschaften zu besitzen. Auf Eosinophilen wurde CD69 zunächst im Zusammenhang mit Asthma bronchiale beschrieben. (Hartnell et al. 1993) CD69 ist bereits als Aktivierungsmarker von Eosinophilen etabliert. (Matsumoto et al. 1998)

CD44 ist ebenfalls kein Eosinophilen-spezifisches Oberflächenprotein und wird zusätzlich auf T-Zellen sowie B-Zellen exprimiert. Zusätzlich zu der Oberfläche von hämatopoetischen Zellen konnte es auf der Oberfläche von Tumorzellen gefunden werden. Die Expression auf Karzinomzellen scheint mit einer Verschlechterung der Prognose assoziiert zu sein. (Matsumura and Tarin 1992; Mayer et al. 1993) CD44 kann die Apoptose einer entarteten Zelle unterdrücken, indem es den Signalweg über Tumorsuppressor p53 hemmt und somit das Tumorstadium fördert. (Godar et al. 2008) Auf Eosinophilen wurde CD44 wie auch CD69 als Aktivierungsmarker beschrieben. (Bochner 2000; Matsumoto et al. 1998)

Die weiteren, untersuchten Proteine, ECP (eosinophiles kationisches Protein) und EPX (eosinophile Peroxidase), sind in eosinophilen Granula enthalten. Bei Aktivierung der Eosinophilen wird der Inhalt jener Granula in die Umgebung freigesetzt. (Egesten et al. 1986; Hamann et al. 1990; Hogan et al. 2008; Rosenberg et al. 1989) Beide Proteine werden grundsätzlich eosinophilen-spezifisch exprimiert, wobei jedoch ECP auch in neutrophilen Granulozyten gefunden wurde. Diese scheinen in der Lage zu sein ECP aus ihrer Umgebung aufzunehmen, vermögen jedoch nicht ECP selbstständig zu exprimieren. (Byström et al. 2002)

Die Degranulation von eosinophilen Granulozyten wird entweder durch Antikörper in Form von Immunglobulinen oder durch eine Aktivierung über das Komplementsystem

ausgelöst. Die Proteine der eosinophilen Granula besitzen besonders zytotoxische Eigenschaften. ECP verursacht Poren der Zellmembran und schädigt so Zellen oder kleinste Organismen. Das Protein EPX bildet außerhalb der eosinophilen Granula reaktive Sauerstoffverbindungen und kann so ebenfalls Zellmembranen schädigen. Beide Granulaproteine schädigen bei Freisetzung das umliegende Gewebe, Viren, Bakterien, Tumorzellen und auch gesundes Gewebe. Die Sekretion der Granulaproteine führt durch Schädigung zu Gewebeumbau, was vorrangig im Falle chronischen Asthmas gezeigt werden konnte. (Brennan et al. 2002; Carlson et al. 1993; Koh et al. 2007; MacPherson et al. 2001; Tomassini et al. 1991; Venge et al. 1999; Young et al. 1986) ECP und EPX dienen als Marker der eosinophilen Degranulation und damit deren Aktivierung. Nur aktivierte Eosinophile sind in Stande ihre Granula zu sezernieren.

Carretero et al. demonstrierte die Möglichkeit eines eosinophilen Markers anhand eines Mausmodells. Hier wurde SiglecF genutzt, um die Präsenz von eosinophilen Granulozyten in Tumoren von Mäusen nachzuweisen. Murines SiglecF stellt das Homolog zu humanem Siglec8 dar. (Carretero et al., 2015) Die Studie von Hufeland et al (Hufeland, 2015) etablierte Siglec8 als Marker für eosinophile Granulozyten im Menschen. Es wurde gezeigt, dass vermehrt Siglec8+ eosinophile Granulozyten auf Gewebeschnitten von nicht metastasierten Malignen Melanomen zu finden sind. Dies bestätigte die Annahme, dass Eosinophile im Malignen Melanom mit einer verbesserten Prognose assoziiert sind.

In dieser Studie wurden Gewebeschnitte von benignen melanozytären Naevi, metastasierten und nicht metastasierten Primärmelanomen sowie loko-regionalen Metastasen und Fernmetastasen auf Tissue-Microarray (TMA) immunhistochemisch mittels spezifischer Antikörper gegen die soeben aufgeführten Proteine analysiert. Die Schnitte wurden histologisch analysiert und die gefärbten Immunzellen (Effektor-T-Zellen sowie eosinophile Granulozyten) händisch ausgezählt. Es erfolgte eine Unterteilung in intra- und peritumorale Lokalisation. Aufgrund des festgelegten Durchmessers jeder Stanze und einer ermittelten prozentualen Abdeckung dieser Fläche konnte die Tumoorfläche sowie die peritumorale Fläche pro Gewebestanze berechnet werden. Daraufhin wurde die Anzahl von gezählten Zellen pro Quadratmillimeter kalkuliert. Wir analysierten die erhobenen Daten bezüglich einer Korrelation zwischen der Anzahl an Immunzellen anhand ihrer Lokalisation und dem Ursprung des Gewebeschnitts. Des Weiteren überprüften wir die Relevanz von Parametern wie T Stadium, Breslow Index, Ulzeration und Photoschaden.

Hier zeigt sich eine signifikante Differenz in der Anzahl von intratumoralen CD8+ Effektor-T-Lymphozyten in nicht metastasierten und metastasierten Primärmelanomen. Zuvor wurde in einem Melanommausmodell gezeigt, dass eosinophile Granulozyten CD8+ Effektor-T-Lymphozyten mittels einer Reihe von Botenstoffen chemotaktisch in das Tumorbett attrahieren können. (Carretero et al. 2015) Diese Beobachtung können wir mit unserer Studie in der humanen Situation deskriptiv bestätigen. In Schnitten des nicht metastasierten Primärmelanoms sind vermehrt Eosinophile sowie CD8+ T-Lymphozyten vorhanden. Dies bestätigt unsere Hypothese, wonach aktivierte Eosinophile durch Sezernierung von Chemokinen, wie beispielsweise CCL5, Effektor-T-Lymphozyten in die Tumormikroumgebung locken und somit die Antitumorimmunantwort effektiv beeinflussen können. Dies ist konkordant mit dem etablierten Wissen, wonach CD8+ Effektor-T-Zellen in der Mikroumgebung des Malignen Melanoms mit einer verbesserten Prognose assoziiert sind.

Die Analyse des Oberflächenmarkers CD69 sowie der Granulaproteine EPX und ECP von eosinophilen Granulozyten wurde wie erläutert durchgeführt. Diese drei Marker weisen ähnliche Ergebnisse für intratumorale Zellen auf. Wir zeigen in dieser Arbeit eine signifikante Differenz der Anzahl von intratumoralen, positiv eingefärbten Eosinophilen auf Schnitten von nicht metastasierten Primärmelanomen zu Schnitten von metastasierten Melanomen. Es sind signifikant mehr Eosinophile in nicht metastasierten Primärmelanomen zu finden. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorherigen Studie von Hufeland et al. in der gezeigt wurde, dass vermehrt Siglec8+ Eosinophile in nicht metastasierten Melanomen zu finden sind. Unsere Ergebnisse ergänzen diese Studie, denn wir zeigen durch unsere Färbung von eosinophilen Aktivitätsmarkern, dass die gefundenen Eosinophilen in der Tumormikroumgebung nicht ruhen sondern aktiviert sind. CD69 ist ein Oberflächenmarker, der in der Literatur als Aktivitätsmarker von eosinophilen Granulozyten etabliert wurde. EPX und ECP sind eosinophile Granulaproteine, die bei Aktivierung der Zelle sezerniert werden. Hier zeigen wir, dass CD69+, EPX+ und ECP+ aktivierte Eosinophile vermehrt in nicht metastasierten Melanomen vorkommen. Damit bestätigen wir, dass eine erhöhte Anzahl dieser aktivierten Immunzellen im Malignen Melanom mit einer verbesserten Prognose einhergehen.

In einer Studie von Krückel et al wurde ECP als Biomarker des Malignen Melanoms untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass erhöhte Level von ECP im Blut von Melanompatienten mit einer negativen Prognose assoziiert ist. (Krückel et al., 2019) Überraschenderweise ging den erhöhten ECP-Werten nicht regelhaft eine Eosinophilie voraus. Nach den Ergebnissen unserer Arbeit wäre ein gegenteiliges Ergebnis zu erwarten gewesen. Wir konnten hier zeigen, dass ECP+ eosinophile Granulozyten der Tumormikroumgebung mit einer verbesserten Prognose im Malignen Melanom einhergehen. Die genannte Studie von Krückel et al. demonstrierte einen gegenteiligen Effekt von ECP im Blut der Melanompatienten. Eine tumorassoziierte Bluteosinophilie konnte in jener Studie jedoch nicht mit einer negativen Prognose assoziiert werden. Zusätzlich wurde die Tumormikroumgebung nicht untersucht, sodass keine Rückschlüsse auf eine mögliche Immunzellinfiltration des Tumorgewebes zu ziehen sind. In dieser Arbeit wurden die Eosinophilenzahlen der Patienten im Blut ebenfalls nicht untersucht. Es scheint essentiell in weiteren Studien die Korrelation zwischen tumorassoziiierter Gewebeeosinophilie sowie Bluteosinophilie weitergehend zu untersuchen sowie die Korrelation der eosinophilen Aktivierungsmarker in der Tumormikroumgebung als auch im Blut von Melanompatienten.

Die Ergebnisse der Auswertung des Oberflächenproteins CD44 unterscheiden sich von den Ergebnissen der anderen Marker. CD44 wurde, wie CD69, in der Literatur als Aktivierungsmarker von eosinophilen Granulozyten beschrieben. Dennoch kann hier keine Signifikanz zwischen der intratumoralen Anzahl der positiven Immunzellen zwischen metastasierten und nicht metastasierten Melanomschnitten gezeigt werden. Unsere Analyse ergab eine signifikante Differenz von ausgezählten Eosinophilen zwischen nicht metastasierten Primären und regionalen Metastasen sowie zwischen metastasierten Primären und regionalen Metastasen. Dieses Ergebnis zeigt sich im Kontrast zu unserer Hypothese als auch zu den Ergebnissen der anderen eosinophilen Marker. Eine mögliche Erklärung ist der geringe Unterschied in der Expression von CD44 bei Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Eosinophile Granulozyten präsentieren CD44 auch in inaktiviertem Zustand auf ihrer Oberfläche. Nach Aktivierung wird die Expression von CD44 nur in geringem Maße hochreguliert, sodass die Differenz zwischen der Ausprägung der CD44 Präsentation auf der

Oberfläche der Immunzelle nur gering ist. (Matsumoto et al., 1998) Möglicherweise ist der Anstieg der Expression des Oberflächenmarkers nach Aktivierung zu marginal um ihn in dieser Studie statistisch zu erfassen. Dies würde erklären, warum keine signifikante Anzahl an CD44+ Eosinophilen in nicht metastasierten Primärmelanomen im Vergleich zu metastasierten Primärmelanomen nachgewiesen werden konnte. CD44 konnte hier nicht als zuverlässiger Aktivierungsmarker von eosinophilen Granulozyten bestätigt werden.

Eine Auswertung der peritumoral lokalisierten Marker-positiven Immunzellen ergab lediglich eine äußerst geringe Anzahl an Zellen, sodass eine statistische Auswertung nicht möglich war. Der Grund für die geringe Anzahl gezählter, peritumoraler Immunzellen liegt in der Auswahl der Stenzen. Das Fenster der Gewebestanzungen wurde sehr eng gefasst, sodass fast nur intratumorales Gewebe abgebildet wurde. Die Stenzen stammen aus dem Zentrum des Tumors anstatt aus dem peripheren Bereich. Somit war auf jeder Stanze prozentual nur eine geringe Fläche an peritumoralem Gewebe repräsentiert und nur eine geringe Anzahl peritumoraler Immunzellen zu sehen, die ausgezählt werden konnten. Dennoch schließen wir daraus nicht, dass peritumoral keine Marker-positiven Immunzellen vorhanden sein können. In einer weiteren Studie mit größeren Gewebestanzungen oder Vollschnitten sollte dieser Sachverhalt erneut geprüft werden.

Des Weiteren untersuchten wir eine Korrelation zwischen den positiven Immunzellen und vorliegendem UV-Schaden (sogenannter Photodamage) der Gewebeproben. Die Ermittlung des Lichtschadens der einzelnen Schnitte erfolgte durch eine histologische Analyse, die von erfahrenen Dermatohistopathologen durchgeführt wurde. Anhand der Degeneration von Kollagenfasern der Haut kann auf einen UV-Schaden rückgeschlossen werden. (Edwards et al. 2001; Schwartz et al. 1989; Trautinger et al. 1994; Varani et al. 2001; Wlaschek et al. 2001) Die Ergebnisse der histologischen Beurteilung wurden auf Plausibilität der Möglichkeit einer Sonnenexposition der entsprechenden Körperstelle geprüft. Wir analysierten die gefärbten Immunzellen bezüglich ihres Vorkommens auf Gewebeschnitten mit und ohne UV-Schaden. Für jedes Markerprotein kann eine signifikante Differenz von intratumoralen Immunzellen und ihrer Lokalisation auf UV-geschädigten Schnitten und Schnitten ohne UV-Schaden präsentiert werden. Intratumorale CD8+ T-Lymphozyten sowie intratumorale, aktivierte eosinophile Granulozyten sind vermehrt in UV-geschädigtem Tumorgewebe zu finden. Ein signifikantes Ergebnis besteht ebenfalls für peritumorale EPX+ und ECP+ Eosinophile sowie für CD8+ Lymphozyten. Auch hier finden sich vermehrt positiv eingefärbte Immunzellen in peritumoraler Lokalisation von Tumoren mit Lichtschaden. Dies spricht dafür, dass ein vorhandener UV-Schaden der Haut, eine verstärkte Immunantwort hervorruft. (Craig et al. 2018; Wagner et al. 2015) Wir konnten ferner zeigen, dass eine verstärkte Immunantwort in Form von einer signifikanten Infiltration mit eosinophilen Granulozyten sowie Effektor-T-Lymphozyten Zeichen einer verbesserten Prognose ist. Folglich besteht die Möglichkeit, dass Tumore, die auf UV-geschädigter Haut entstehen, durch ihre verstärkte Immunantwort ebenfalls eine verbesserte Prognose haben.

Wir analysierten außerdem die Tumorgroße sowie Ulzeration des Tumors in Korrelation mit der Immunzellinfiltration. Dazu verglichen wir die T Stadien der Tumoren sowie den Breslow Index und vorhandene Ulzeration mit der Anzahl ausgezählter, positiver Immunzellen. Diese Analyse zeigt keine signifikanten Ergebnisse. Da kleine Melanome mit niedrigen T Klassen sowie einem niedrigen

Breslow Index laut AJCC Klassifikation 8. Auflage eine bessere Prognose und ein geringeres Risiko der Metastasierung haben, erwarteten wir ein Ergebnis, das diese Annahmen widerspiegelt. Viele Studien bestätigten bereits, dass ein geringes Stadium in der AJCC Klassifikation, die durch Breslow Index und Ulzeration wesentlich definiert wird, mit einer verbesserten Prognose assoziiert ist. (Balch et al., 2001, 2009; Breslow 1970) Dies spiegelt sich hier jedoch nicht in der Ausprägung der Immuninfiltration wieder. Das Maß der Immuninfiltration durch eosinophile Granulozyten und zytotoxische T-Lymphozyten ist unabhängig von der Größe der Tumoren und dessen Ulzeration. Wir folgern daraus, dass selbst große Melanome, die eine starke Infiltration mit definierten Immunzellen in ihrer Mikroumgebung aufweisen, eine verbesserte Prognose haben können. Im Kontrast dazu gibt es offensichtlich Primärtumoren von geringer vertikaler Dicke mit wenig spezifischer Aktivität des Immunsystems in ihrer Mikroumgebung, die dadurch bedingt eine schlechtere Prognose besitzen. Basierend darauf lässt sich die Hypothese formulieren, dass der vertikale Tumordurchmesser und der Ulzerationsstatus nach der aktuellen AJCC Klassifikation nicht die einzig relevanten Faktoren für die Einschätzung der Prognose des Malignen Melanoms sein können.

Unsere Hypothese, wonach aktivierte eosinophile Granulozyten in der Tumormikroumgebung präsent sind und deren Anzahl mit einer vermehrten CD8+ Lymphozyteninfiltration einhergeht, wird bestätigt. Außerdem bestätigt die vermehrte Anzahl der Immunzellen in nicht metastasierten Melanomen unsere Annahme, dass eine starke Immunzellinfiltration die Prognose der Tumorerkrankung verbessert. Wir können außerdem den Nutzen von CD69 sowie ECP und EPX als Aktivitätsmarker von eosinophilen Granulozyten bestätigen. Des Weiteren präsentieren wir bemerkenswerte Ergebnisse zu Malignen Melanomen mit Photodamage. Aus unseren Ergebnissen geht hervor, dass UV-geschädigte Melanome eine verstärkte adaptive Immunantwort hervorrufen. Wir formulieren die Hypothese, dass diese Tumoren eine verbesserte Prognose aufweisen. Des Weiteren zeigen wir, dass die Tumorgöße und die Ulzeration des Tumors unabhängig von Immunzellinfiltrationen sind. Hier besteht der klare Hinweis, dass große Tumoren mit starker Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Effektor-T-Zellen trotz ihres fortgeschrittenen AJCC Stadiums eine gute Prognose besitzen können.

In dieser Studie verwendeten wir zwei Tissue Microarrays (TMA) mit 213 ausgewerteten Proben von 47 Patienten, auf dessen Verwendung sich die Vorteile dieses Studienkonzeptes zurückführen lassen. Durch Nutzung der TMA's besteht die Möglichkeit viele Stenzen von verschiedenen Tumoren bzw. Gewebeproben zu untersuchen. Die hohe Anzahl an Stenzen ermöglicht die Analyse einer großen Anzahl an Gewebeproben von gesundem Gewebe oder Tumoren. Proben von verschiedenen Patienten oder mehrere Proben von einem Patienten, wie in dieser Studie, können analysiert und verglichen werden. Des Weiteren können mit dem TMA System viele Färbungen derselben Gewebeproben gemacht werden. So kann dieselbe Kohorte an Proben auf verschiedenste Weise untersucht werden. Folglich ermöglicht die Nutzung der TMA's die Erhebung einer großen Datenmenge mit verhältnismäßig geringem Zeitaufwand. In unsere Auswertungen inkludierten wir keine absolute Anzahl von Zellen, sondern berechneten die Anzahl der Zellen pro Quadratmillimeter. Dies ermöglichte einen guten Vergleich zwischen den Stenzen.

In unserer Studie war ein Patientenkollektiv von insgesamt 47 Patienten vertreten mit Proben von 76 Nävuszellnaevi, 106 Primärmelanome und 140 Metastasen. Davon

waren 213 Stenzen auswertbar. Dies stellt ein eher kleines Kollektiv dar und schränkt die Aussagekraft der Subgruppenanalyse ein. Die Auswahl der Regions-of-interest innerhalb der Gewebeproben wurde durch erfahrene Dermatohistopathologen getroffen. Dennoch wurde nur ein kleiner Teil der Gesamtprobe für den TMA ausgewählt. Die Stenzen der TMA durchmessen nur 0,3 bzw 1 Millimeter und bilden folglich nur einen kleinen Bereich des Tumors bzw. der Gewebeprobe ab. Die Randbereiche des Tumors sind somit nicht beurteilbar. In unserer Studie wurde die Fläche der Stenzen in intra- sowie peritumoral unterteilt. Die Fläche der Stenzen beträgt eine geringe Größe und wurde sehr eng gefasst. Die Ausschnitte, die zur Analyse gestanzt wurde, beinhalten fast ausschließlich intratumorales Gewebe aus dem Core des Tumors. Somit ist nur ein geringer Anteil an peritumoralem Gewebe auf den Stenzen und den TMA's abgebildet. Die Randbereiche des Tumors sind lediglich bis zu einem gewissen Grad beurteilbar genauso wie der peritumorale Bereich. Aufgrund der äußerst geringen Anzahl an Marker-positiven Immunzellen mit peritumoraler Lokalisation erbrachte eine statistische Analyse der Immunzellen keine verwertbaren Ergebnisse. Dies stellt eine Beschränkung dieser Studie dar. In weiterführenden Projekten sollte eine erneute Analyse durchgeführt werden mit größeren Stenzen bzw. Vollschnitten oder einem Fokus der Stanze auf den Randbereich des Tumors.

4.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Studie wurden eosinophile Aktivierungsmarker aus der Literatur bzw. aus globalen Expressionsanalysen identifiziert und in ihrer Expression im Tumor-Mikromilieu des Malignen Melanoms analysiert. Wir erzielten überraschende Ergebnisse, die demonstrieren, dass drei unserer Marker signifikant mit der Prognose der Tumoren positiv korrelieren.

In weiterführenden Studien sollten die Limitationen dieser Arbeit beachtet und wenn möglich angepasst werden. Die Analyse der peritumoral gelegenen Eosinophilen war in dieser Studie nur eingeschränkt möglich.

Ein empfehlenswerter Ansatz für eine weiterführende Studie wäre diese Limitation zu beheben und eine Analyse mit Vollschnitten durchzuführen oder die Stenzen anstatt aus dem Tumorzentrum aus dem Tumorrandbereich auszuwählen. Diese Zone wird in der Literatur häufig als Invasive Margin bezeichnet. Eine Darstellung der Invasiven Front (sogenannter invasive margin) und die Analyse von eosinophilen Granulozyten in diesem Bereich könnten wichtige, neue Erkenntnisse bringen. Außerdem sollte eine größere Kohorte rekrutiert werden, um die begrenzte Patientenzahl dieser Studie auszuweiten. Des Weiteren konnte unsere Studie nur retrospektive Daten generieren. Eine prospektive Kohortenstudie mit regelmäßigen Kontrollen der Patienten insbesondere eine Korrelation von Gewebs- und Bluteosinophilie würde die Datenqualität verbessern und die Forschung bezüglich dieser Thematik voran bringen. Des Weiteren konnten wir in dieser Studie zeigen, dass Melanome, die auf lichtgeschädigter Haut entstehen, eine stärkere Immunzellinfiltration mit eosinophilen Granulozyten sowie T-Effektorzellen in ihrer Tumormikroumgebung zeigen. Dies lässt die Hypothese zu, dass Tumoren auf UV-geschädigter Haut eine verbesserte Prognose aufweisen. In weiterführenden Studien sollte dieser Sachverhalt genauer untersucht werden.

In dieser Studie konnten wir die Limitationen der bisher bestehenden AJCC Klassifikation des Malignen Melanoms aufzeigen. Wir korrelierten die Anzahl der

Immunzellen in der Tumormikroumgebung mit bestehenden Parametern der AJCC Klassifikation – T Stadium, Breslow Index sowie Ulzeration. Hier konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Wir schließen daraus, dass Melanome mit einer großen Tumordicke oder Ulzeration bestehen können, die durch ihre Immunzellinfiltration eine deutlich bessere Prognose aufweisen, als die AJCC Klassifikation prognostizieren würde. Wie bereits von Galon et al postuliert, besteht die Möglichkeit einer Erweiterung der etablierten TNM-Klassifikation bzw. im Falle des Melanoms der AJCC-Klassifikation um einen Immunoscore. (Galon et al. 2013, 2016)

Langfristiges Ziel der Tumormikroumforschung im Malignen Melanom ist es Biomarker zu identifizieren und als einfachen Bluttest zu etablieren. Ein Biomarker könnte ein von eosinophilen Granulozyten produziertes Protein oder ein Stoffwechselprodukt von Eosinophilen wie beispielsweise ECP oder EPX darstellen. Genauso werden beeinflussende Faktoren von Eosinophilen wie Chemokine und Zytokine als potentielle Biomarker herangezogen. In dieser Studie wurde erneut bestätigt, dass die Aktivierungsmarker von Eosinophilen mit einer verbesserten Prognose korrelieren. Der Oberflächenmarker CD69 und die Granulaproteine EPX und ECP stellen potentielle Biomarker des Malignen Melanoms dar. Eine aktuelle Arbeit weist ECP im Blut bei Melanompatienten einen negativen, prädiktiven Wert zu. (Krückel et al., 2019)

Demgegenüber zeigen unsere Ergebnisse eine Korrelation der Präsenz ECP+ Eosinophile in der Tumormikroumgebung mit einer verbesserten Prognose. Krückel et al. analysiert jedoch nicht die Tumormikroumgebung sondern lediglich das periphere Blut, sodass ein Vergleich mit dieser Arbeit schwierig ist. Weitere Studien zur Analyse der Korrelation zwischen tumorassoziierter Gewebeeosinophilie sowie tumorassoziierter Bluteosinophilie und deren eosinophile Aktivierungsmarker erscheinen aufgrund dieser Arbeit essentiell.

Zusätzlich ist weitere Forschung zur Klärung der mechanistischen Rolle eosinophiler Granulozyten im Melanom-Mikromilieu notwendig, um neben Biomarkern für die klinische Betreuung von Melanompatienten auch Zielstrukturen therapeutischer Intervention zu identifizieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Eosinophile Granulozyten sind in den letzten Jahren in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Bereits für eine ganze Reihe verschiedener Tumorentitäten, wie beispielsweise für das Kolorektale Karzinom, konnte etabliert werden, dass eine Infiltration der Tumormikroumgebung mit eosinophilen Granulozyten mit einer verbesserten Prognose assoziiert ist. Auch für das Maligne Melanom konnte dieser Effekt gezeigt werden. Die tumorabwehrenden Eigenschaften von eosinophilen Granulozyten sind auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen. Sie sezernieren Zytokine und Chemokine, die CD8+ T-Effektorzellen in die Tumormikroumgebung attrahieren, wodurch eine zelluläre T-Zell-vermittelte Antitumor-Immunität hervorgerufen wird. Sie hemmen außerdem die Tumorangiogenese und promovieren die M1-Polarisierung von tumorinfiltrierenden Makrophagen. Diese Mechanismen fördern eine effektive Tumorimmunantwort und verbessern die Prognose der Erkrankung. Erste Arbeiten unserer Arbeitsgruppen lassen darauf schließen, dass lediglich aktivierte Eosinophile diese Eigenschaften aufweisen. Die vorliegende Studie wurde konzipiert, um den Aktivitätszustand von eosinophilen Granulozyten und die Kopräsenz von CD8+-T-Lymphozyten in der Tumormikroumgebung und deren Effekt auf die Prognose des Malignen Melanoms tiefergehend zu untersuchen.

Die Auswahl eosinophiler Proteine zur Markierung des Aktivitätszustands erfolgte basierend auf der Hypothese eosinophiler Polarisierung sowie globaler Expressionsanalysen polarisierter eosinophiler Granulozyten. Neben den eosinophilen Oberflächenproteinen CD69 und CD44 wurden die eosinophilen Granulaproteine ECP und EPX als potentielle Aktivierungsmarker ausgewählt. Zusätzlich diente das Oberflächenprotein CD8 als Marker für Effektor-T-Zellen.

Für die Immuninfiltratanalyse standen 322 Gewebeproben von primären Melanomen, assoziierten Metastasen und korrespondierenden melanozytären Naevi von 47 Patienten zur Verfügung. Jeder Patient ist durch eine Probe eines primären Melanoms und eines korrespondierenden Naevus oder eines primären Melanoms und einer Melanommetastase repräsentiert. Für die Analyse wurden die Gewebeproben als Stanzzyylinder ausgewählter Geweberegionen auf zwei Tissue-Microarrays (TMA) assembliert und mittels Immunhistochemie eingefärbt. Mit dem Ziel der genauen Analyse des Immunzellinfiltrats wurden die TMA software-gestützt mikroskopisch untersucht und mit klinisch-histopathologischen Parametern wie T-Stadium, Breslow Index, Ulzeration, Lichtschaden und Krankheitsverlauf des Patienten korreliert. Insbesondere wurden Primärmelanome nach Rezidiv oder ohne Rezidiv im Beobachtungszeitraum von median 34,9 Monaten unterschieden.

Die Analyse von CD69, EPX und ECP ergab eine hochsignifikante Differenz der intratumoralen, positiv eingefärbten eosinophilen Granulozyten des metastasierten und nicht metastasierten Melanoms. Es fand sich eine hochsignifikante erhöhte Anzahl an aktivierter Eosinophilen im Tumorgewebe des nicht rezidierten Primärmelanoms. Dies korrelierte positiv mit der Präsenz von intratumoralen CD8+-T-Effektorzellen. Eine vermehrte Infiltration der Tumormikroumgebung mit eosinophilen Granulozyten sowie CD8+-T-Effektorzellen ist demnach mit einer verbesserten Prognose im Malignen Melanom assoziiert. Zusätzlich demonstrieren wir hier, dass ein relevanter Anteil an eosinophilen Granulozyten in der Tumormikroumgebung einen Aktivierungszustand im Sinne einer Expression von CD69, EPX oder ECP aufweisen muss. Zusätzlich konnte der Effekt von UV-Schädigung auf die Immunzellinfiltration gezeigt werden. Melanome, die auf lichtgeschädigter Haut entstanden, weisen eine vermehrte Infiltration von eosinophilen Granulozyten und CD8+ T-Lymphozyten auf.

Dies stützt bisherige Forschungsergebnisse, wonach ein vorhandener UV-Schaden der Haut eine verstärkte Immunantwort hervorruft. Demnach erscheint möglich, dass auf lichtgeschädigter Haut entstandene Melanome eine verbesserte Prognose aufweisen.

In der Analyse der etablierten klinisch-histopathologischen Parameter der AJCC Klassifikation des Malignen Melanoms zeigte sich keine signifikante Korrelation von Immunzellinfiltration und T-Stadium, Breslow Index oder Ulzeration. Dies verdeutlicht die Unabhängigkeit der Immunzellinfiltration in der Tumormikroumgebung von bisher etablierten prognostischen Parametern.

Die vorliegende Studie stellt eine retrospektive Analyse mit einem relativ kleinen Patientenkollektiv dar. Weiterführende Arbeiten sollten einen prospektiven Ansatz mit einem größeren Patientenkollektiv wählen. Ferner wurde für diese Arbeit ein hoher Qualitätsstandard an die Integrität des auf den TMA repräsentierten Tumorgewebes und die immunhistochemische Färbung gelegt und Stanzzyylinder aus dem Tumorzentrum gewählt. In weiteren Analysen der Immunzellinfiltration sollten Vollschnitte oder zusätzlich Stanzzyylinder aus der invasiven Front des Malignen Melanoms gewählt werden.

Trotz dieser Einschränkungen konnte die vorliegende Studie nachweisen, dass aktivierte eosinophile Granulozyten in Kopräsenz mit T-Effektorzellen in der Tumormikroumgebung des Primärmelanoms mit einer verbesserten Prognose assoziiert sind. Ferner konnten CD69, ECP und EPX als Aktivierungsmarker eosinophiler Granulozyten im malignen Melanom erstbeschrieben werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Acharya, K.R., and Ackerman, S.J. (2014). Eosinophil granule proteins: Form and function. *J. Biol. Chem.* 289, 17406–17415.

Ackerman, S.J. (2013). To be, or not to be, an eosinophil: That is the ?. *Blood* 122, 621–623.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 3983–3988.

Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol. Rev.* 222, 155–161.

Angell, H., and Galon, J. (2013). From the immune contexture to the Immunoscore: The role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 261–267.

Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303–1313.

Awad, A., Yassine, H., Barrier, M., Vorng, H., Marquillies, P., Tsicopoulos, A., and Duez, C. (2014). Natural killer cells induce eosinophil activation and apoptosis. *PLoS One* 9, e94492.

Azimi, F., Scolyer, R.A., Rumcheva, P., Moncrieff, M., Murali, R., McCarthy, S.W., Saw, R.P., and Thompson, J.F. (2012). Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* 30, 2678–2683.

Baaten, B.J.G., Li, C.-R., Deiro, M.F., Lin, M.M., Linton, P.J., and Bradley, L.M. (2010). CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. *Immunity* 32, 104–115.

Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Gershenwald, J.E., Houghton A., J., Kirkwood, J.M., et al. (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* 19, 3635–3648.

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S. -j., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., et al. (2009). Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J. Clin. Oncol.* 27, 6199–6206.

Bauer, J., and Garbe, C. (2003). Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res.* 16, 297–306.

- Berghoff, A.S., Fuchs, E., Ricken, G., Mlecnik, B., Bindea, G., Spanberger, T., Hackl, M., Widhalm, G., Dieckmann, K., Prayer, D. (2016). Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with extent of brain edema and overall survival time in patients with brain metastases. *Oncoimmunology* 5, e1057388.
- Betts, G., Jones, E., Junaid, S., El-Shanawany, T., Scurr, M., Mizen, P., Kumar, M., Jones, S., Rees, B., Williams, G. (2012). Suppression of tumour-specific CD4⁺ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut* 61, 1163–1171.
- Biedermann, T., Heppt, W., Renz, H., and Röcken, M. (2016). Allergologie, Antigen- bzw. Allergenpräsentation. Brüggem, M.-C., Epstein, M., Stingl, G. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 49-69.
- Bochner, B.S. (2000). Systemic activation of basophils and eosinophils: Markers and consequences. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, S292–S302.
- Boix, E., Torrent, M., Sánchez, D., and Nogués, M.V. (2008). The antipathogen activities of eosinophil cationic protein. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9, 141–152.
- Bonnelykke-Behrndtz, M.L., Schmidt, H., Christensen, I.J., Damsgaard, T.E., Møller, H.J., Bastholt, L., Norgaard, P.H., and Steiniche, T. (2014). Prognostic stratification of ulcerated melanoma not only the extent matters. *Am. J. Clin. Pathol.* 142, 845–856.
- Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J.Y., Barnéon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony-Lafontaine, J., and Godard, P. (1990). Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* 323, 1033–1039.
- Brennan, M.L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M.T., et al. (2002). A tale of two controversies. Defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* 277, 17415–17427.
- Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg.* 172, 902–908.
- Bullwinkel, J., Baron-Lühr, B., Lüdemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., and Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.* 206, 624–635.
- Byström, J., Garcia, R.C., Håkansson, L., Karawajczyk, M., Moberg, L., Soukka, J., and Venge, P. (2002). Eosinophil cationic protein is stored in, but not produced by, peripheral blood neutrophils. *Clin. Exp. Allergy* 32, 1082–1091.
- Carlson, J.A., Slominski, A., Linette, G.P., Jr, M.C.M., and Ross, J.S. (2003). Biomarkers in melanoma: staging, prognosis and detection of early metastases. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3, 303–330.

Carlson, M., Peterson, C., and Venge, P. (1993). The influence of IL-3, IL-5, and GM-CSF on normal human eosinophil and neutrophil C3b-induced degranulation. *Allergy* 48, 437–442.

Carretero, R., Sektioglu, I.M., Garbi, N., Salgado, O.C., Beckhove, P., and Hämmerling, G.J. (2015). Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8(+) T cells. *Nat. Immunol.* 16, 609–617.

Caruso, R.A., Parisi, A., Quattrocchi, E., Scardigno, M., Branca, G., Parisi, C., Lucianò, R., Paparo, D., and Fedele, F. (2011). Ultrastructural Descriptions of Heterotypic Aggregation between Eosinophils and Tumor Cells in Human Gastric Carcinomas. *Ultrastruct. Pathol.* 35, 145–149.

Casper, D.J., Ross, K.I., Messina, J.L., Sondak, V.K., Bodden, C.N., McCardle, T.W., and Glass, L.F. (2010). Use of anti-phosphohistone H3 immunohistochemistry to determine mitotic rate in thin melanoma. *Am. J. Dermatopathol.* 32, 650–654.

Chen, P., Huang, Y., Bong, R., Ding, Y., Song, N., Wang, X., Song, X., and Luo, Y. (2011). Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. *Clin. Cancer Res.* 17, 7230–7239.

Cianchetti, S., Bacci, E., Ruocco, L., Pavia, T., Bartoli, M.L., Cardini, C., Costa, F., Di Franco, A., Malagrino, L., Novelli, F., et al. (2014). Are sputum eosinophil cationic protein and eosinophils differently associated with clinical and functional findings of asthma? *Clin. Exp. Allergy* 44, 673–680.

Clemente, C.G., Mihm, M.C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77, 1303–1310.

Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65, 10946–10951.

Contreras, A., Sen, S., Tatar, A.J., Mahvi, D.A., Meyers, J. V, Srinand, P., Suresh, M., and Cho, C.S. (2016). Enhanced local and systemic anti-melanoma CD8+ T cell responses after memory T cell-based adoptive immunotherapy in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 601–611.

Cormier, S.A., Taranova, A.G., Bedient, C., Nguyen, T., Protheroe, C., Pero, R., Dimina, D., Ochkur, S.I., O'Neill, K., Colbert, D., et al. (2006). Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. *J. Leukoc. Biol.* 79, 1131–1139.

Craig, S., Earnshaw, C.H., and Virós, A. (2018). Ultraviolet light and melanoma. *J. Pathol.* 244, 578–585.

van Dalen, C.J., and Kettle, A.J. (2001). Substrates and products of eosinophil peroxidase. *Biochem. J.* 358, 233–239.

Davis, B.P., and Rothenberg, M.E. (2014). Eosinophils and cancer. *Cancer Immunol Res* 2, 1–8.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2019). S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Malignen Melanoms. Langversion. Version 3.2. AWMF-Register-Nummer: 032/024OL. Online: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/> Stand: 20.12.19

Doyle, A.D., Jacobsen, E.A., Ochkur, S.I., McGarry, M.P., Shim, K.G., Nguyen, D.T.C., Protheroe, C., Colbert, D., Kloeber, J., Neely, J., et al. (2013). Expression of the secondary granule proteins major basic protein 1 (MBP-1) and eosinophil peroxidase (EPX) is required for eosinophilopoiesis in mice. *Blood* 122, 781–790.

Edwards, C., Pearse, A., Marks, R., Nishimori, Y., Matsumoto, K., and Kawai, M. (2001). Degenerative Alterations of Dermal Collagen Fiber Bundles in Photodamaged Human Skin and UV-Irradiated Hairless Mouse Skin: Possible Effect on Decreasing Skin Mechanical Properties and Appearance of Wrinkles. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1458–1463.

Egesten, A., Alumets, J., von Mecklenburg, C., Palmegren, M., and Olsson, I. (1986). Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. *J. Histochem. Cytochem.* 34, 1399–1403.

Elmose, C., Sverrild, A., van der Sluis, S., Kyvik, K.O., Backer, V., and Thomsen, S.F. (2014). Genetic factors explain half of all variance in serum eosinophil cationic protein. *Clin. Exp. Allergy* 44, 1525–1530.

Enblad, G., Sundstrom, C., and Glimelius, B. (1993). Infiltration of eosinophils in Hodgkin's disease involved lymph nodes predicts prognosis. *Hematol. Oncol.* 11, 187–193.

English, J.S., Swerdlow, A.J., Mackie, R.M., O'Doherty, C.J., Hunter, J.A., Clark, J., and Hole, D.J. (1988). Site-specific melanocytic naevus counts as predictors of whole body naevi. *Br. J. Dermatol.* 118, 641–644.

Estko, M., Baumgartner, S., Urech, K., Kunz, M., Regueiro, U., Heusser, P., and Weissenstein, U. (2015). Tumour cell derived effects on monocyte/macrophage polarization and function and modulatory potential of *Viscum album* lipophilic extract in vitro. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 130.

Fernández-Aceñero, M.J., Galindo-Gallego, M., Sanz, J., and Aljama, A. (2000). Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer* 88, 1544–1548.

Foerster, M., Haefner, D., and Kroegel, C. (2002). Bcl-2-mediated regulation of CD69-induced apoptosis of human eosinophils: Identification and characterization of a novel receptor-induced mechanism and relationship to CD95-transduced signalling. *Scand. J. Immunol.* 56, 417–428.

Fortes, C., Mastroeni, S., Mannooranparampil, T.J., Passarelli, F., Zappalà, A., Annessi, G., Marino, C., Caggiati, A., Russo, N., and Michelozzi, P. (2015). Tumor-infiltrating lymphocytes predict cutaneous melanoma survival. *Melanoma Res.* 25, 306–311.

Frahm, S.O., Schubert, C., Parwaresch, R., and Rudolph, P. (2001). High proliferative activity may predict early metastasis of thin melanomas. *Hum. Pathol.* 32, 1376–1381.

Franklin, R.A., Liao, W., Sarkar, A., Kim, M. V, Bivona, M.R., Liu, K., Pamer, E.G., and Li, M.O. (2014). The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* 344, 921–925.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.

Fujimura, T., Kakizaki, A., Furudate, S., Kambayashi, Y., and Aiba, S. (2016). Tumor-associated macrophages in skin: How to treat their heterogeneity and plasticity. *J. Dermatol. Sci.* 83, 167–173.

Furbert-Harris, P., Parish-Gause, D., Laniyan, I., Hunter, K.A., Okomo-Awich, J., Vaughn, T.R., Forrest, K.C., Howland, C., Abdelnaby, A., and Oredipe, O.A. (2003). Inhibition of prostate cancer cell growth by activated eosinophils. *Prostate* 57, 165–175.

Furtmüller, P.G., Zederbauer, M., Jantschko, W., Helm, J., Bogner, M., Jakopitsch, C., and Obinger, C. (2006). Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 445, 199–213.

Galdiero, M.R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., and Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 218, 1402–1410.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* (80-.). 313, 1960–1964.

Galon, J., Fridman, W.H., and Pages, F. (2007). The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: A novel perspective. *Cancer Res.* 67, 1883–1886.

Galon, J., Franck, P., Marincola, F.M., Angell, H.K., Thurin, M., Lugli, A., Zlobec, I., Berger, A., Bifulco, C., Botti, G., et al. (2012). Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J. Transl. Med.* 10, 205.

Galon, J., Angell, H., Bedognetti, D., and Marincola, F. (2013). The Continuum of Cancer Immunosurveillance: Prognostic, Predictive, and Mechanistic Signatures. *Immunity* 39, 11–26.

Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Berger, A., Lagorce, C., Lugli, A., Zlobec, I., Hartmann, A., Bifulco, C., et al. (2014). Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.* 232, 199–209.

Galon, J., Fox, B.A., Bifulco, C.B., Masucci, G., Rau, T., Botti, G., Marincola, F.M., Ciliberto, G., Pages, F., Ascierto, P.A., et al. (2016). Immunoscore and Immunoprofiling in cancer: an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015. *J. Transl. Med.* 14, 273.

Gebhardt, C., Sevko, A., Jiang, H., Lichtenberger, R., Reith, M., Tarnanidis, K., Holland-Letz, T., Umansky, L., Beckhove, P., Sucker, A., et al. (2015). Myeloid Cells and Related Chronic Inflammatory Factors as Novel Predictive Markers in Melanoma Treatment with Ipilimumab. *Clin. Cancer Res.* 21, 5453–5459.

GEKID Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V. (2011): Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID). Online: <https://www.gekid.de>. Stand: 13.02.19.

Gershenwald, J.E., Scolyer, R.A., Hess, K.R., Sondak, V.K., Long, G. V, Ross, M.I., Lazar, A.J., Faries, M.B., Kirkwood, J.M., McArthur, G.A., et al. (2017). Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA. Cancer J. Clin.* 67, 472–492.

Ghebeh, H., Mohammed, S., Al-Omair, A., Qattant, A., Lehe, C., Al-Qudaihi, G., Elkum, N., Alshabanah, M., Bin Amer, S., Tulbah, A., et al. (2006). The B7-H1 (PD-L1) T Lymphocyte-Inhibitory Molecule Is Expressed in Breast Cancer Patients with Infiltrating Ductal Carcinoma: Correlation with Important High-Risk Prognostic Factors. *Neoplasia* 8, 190–198.

Giembycz, M.A., and Lindsay, M.A. (1999). Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol. Rev.* 51, 213–340.

Gleich, G.J., and Adolphson, C.R. (1986). The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv. Immunol.* 39, 177–253.

Glimelius, I., Rubin, J., Fischer, M., Molin, D., Amini, R.M., Venge, P., and Enblad, G. (2011). Effect of eosinophil cationic protein (ECP) on Hodgkin lymphoma cell lines. *Exp. Hematol.* 39, 850–858.

Godar, S., Ince, T.A., Bell, G.W., Feldser, D., Donaher, J.L., Bergh, J., Liu, A., Miu, K., Watnick, R.S., Reinhardt, F., et al. (2008). Growth-inhibitory and tumor- suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell* 134, 62–73.

Goff, S.L., Smith, F.O., Klapper, J.A., Sherry, R., Wunderlich, J.R., Steinberg, S.M., White, D., Rosenberg, S.A., Dudley, M.E., and Yang, J.C. (2010). Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: analysis of tumors resected for TIL. *J. Immunother.* 33, 840–847.

Gooden, M.J.M., de Bock, G.H., Leffers, N., Daemen, T., and Nijman, H.W. (2011). The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br. J. Cancer* 105, 93–103.

Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). THE B7 FAMILY REVISITED. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 515–548.

de Groen, P.C., Kephart, G.M., Gleich, G.J., and Ludwig, J. (1994). The eosinophil as an effector cell of the immune response during hepatic allograft rejection. *Hepatology* 20, 654–662.

Gutkin, D.W., and Shurin, M.R. (2014). Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration. *Cancer Immunol. Immunother.* 63, 45–57.

Halama, N., Michel, S., Kloor, M., Zoernig, I., Benner, A., Spille, A., Pommerencke, T., Von Knebel Doeberitz, M., Folprecht, G., Lubber, B., et al. (2011). Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res.* 71, 5670–5677.

Hale, C.S., Qian, M., Ma, M.W., Scanlon, P., Berman, R.S., Shapiro, R.L., Pavlick, A.C., Shao, Y., Polsky, D., Osman, I., et al. (2013). Mitotic rate in melanoma: Prognostic value of immunostaining and computer-assisted image analysis. *Am. J. Surg. Pathol.* 37, 882–889.

Hamann, K.J., Ten, R.M., Loegering, D.A., Jenkins, R.B., Heise, M.T., Schad, C.R., Pease, L.R., Gleich, G.J., and Barker, R.L. (1990). Structure and chromosome localization of the human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein genes: Evidence for intronless coding sequences in the ribonuclease gene superfamily. *Genomics* 7, 535–546.

Harbaum, L., Pollheimer, M.J., Kornprat, P., Lindtner, R.A., Bokemeyer, C., and Langner, C. (2015). Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer. *Mod. Pathol.* 28, 403–413.

Harfi, I., Schandené, L., Dremier, S., and Roufosse, F. (2013). Eosinophils affect functions of in vitro-activated human CD3-CD4+ T cells. *J. Transl. Med.* 11, 112.

Hartnell, A., Robinson, D.S., Kay, A.B., and Wardlaw, A.J. (1993). CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 80, 281–286.

Hauschild, A., Garbe, C., Bauer, J., Hamm, H., Kerl, H., Reusch, M., Rompel, R., Schlaeger, M. (2011). Melanozytäre Nävi. *J. Der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft* 9, 723–734.

Hazan, C., Melzer, K., Panageas, K.S., Li, E., Kamino, H., Kopf, A., Cordon-Cardo, C., Osman, I., and Polsky, D. (2002). Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 95, 634–640.

- Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., and Allis, C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348–360.
- Herbst, R.S., Soria, J.-C., Kowanetz, M., Fine, G.D., Hamid, O., Kohrt, H.E.K., Horn, L., Lawrence, D.P., Rost, S., Way, D.N.A., et al. (2014). HHS Public Access. *Nature* 515, 563–567.
- Hillen, F., Baeten, C.I.M., Van De Winkel, A., Creytens, D., Van Der Schaft, D.W.J., Winnepenninckx, V., and Griffioen, A.W. (2008). Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 97–106.
- Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P., Kay, A.B., and Rothenberg, M.E. (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clinical and Experimental Allergy* 38, 709–750.
- Van Houdt, I.S., Sluijter, B.J.R., Moesbergen, L.M., Vos, W.M., De Gruijl, T.D., Molenkamp, B.G., Van Den Eertwegh, A.J.M., Hooijberg, E., Van Leeuwen, P.A.M., Meijer, C.J.L.M., et al. (2008). Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int. J. Cancer* 123, 609–615.
- Huang, C., Liu, X.J., QunZhou, Xie, J., Ma, T.T., Meng, X.M., and Li, J. (2016). MiR-146a modulates macrophage polarization by inhibiting Notch1 pathway in RAW264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 32, 46–54.
- Hufeland, A. (2015). Immuninfiltratanalyse in primären Melanomen, assoziierten Metastasen sowie korrespondierenden melanozytären Naevi. Med. Dissertation. Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg.
- Humbles, A.A., Lloyd, C.M., McMillan, S.J., Friend, D.S., Xanthou, G., McKenna, E.E., Ghiran, S., Gerard, N.P., Yu, C., Orkin, S.H., et al. (2004). A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 305, 1776–1779.
- Ikenberg, K., Pfaltz, M., Rakozzy, C., and Kempf, W. (2012). Immunohistochemical dual staining as an adjunct in assessment of mitotic activity in melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 39, 324–330.
- Ishibashi, S., Ohashi, Y., Suzuki, T., Miyazaki, S., Moriya, T., Satomi, S., and Sasano, H. (2006). Tumor-associated tissue eosinophilia in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 26, 1419–1424.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11, 3887–3895.

Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 12293–12297.

Jensen, T.O., Schmidt, H., Møller, H.J., Donskov, F., Høyer, M., Sjoegren, P., Christensen, I.J., and Steiniche, T. (2012). Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 118, 2476–2485.

Jinushi, M., and Komohara, Y. (2015). Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1855, 123–130.

Joshi, N.S., Akama-Garren, E.H., Lu, Y., Lee, D.Y., Chang, G.P., Li, A., DuPage, M., Tammela, T., Kerper, N.R., Farago, A.F., et al. (2015). Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses. *Immunity* 43, 579–590.

Julius, P., Luttmann, W., Knoechel, B., Kroegel, C., Matthys, H., and Virchow, J.C. (1999). CD69 surface expression on human lung eosinophils after segmental allergen provocation. *Eur. Respir. J.* 13, 1253–1259.

Kaluza, K.M., Thompson, J.M., Kottke, T.J., Flynn Gilmer, H.C., Knutson, D.L., and Vile, R.G. (2012). Adoptive T cell therapy promotes the emergence of genomically altered tumor escape variants. *Int. J. Cancer* 131, 844–854.

Kapp, A. (1993). The role of eosinophilic granulocytes for the pathogenesis of atopic dermatitis/neurodermatitis. Eosinophilic products as markers of disease activity. *Der Hautarzt; Zeitschrift Für Dermatologie, Venerol. Und Verwandte Gebiete* 44, 432–436.

Karimi, S., Chattopadhyay, S., and Chakraborty, N.G. (2015). Manipulation of regulatory T cells and antigen-specific cytotoxic T lymphocyte-based tumour immunotherapy. *Immunology* 144, 186–196.

Kay, A.B. (2015). The early history of the eosinophil. *Clin. Exp. Allergy* 45, 575–582.
Kesmodel, S.B., Karakousis, G.C., Botbyl, J.D., Canter, R.J., Lewis, R.T., Wahl, P.M., Terhune, K.P., Alavi, A., Elder, D.E., Ming, M.E., et al. (2005). Mitotic rate as a predictor of sentinel lymph node positivity in patients with thin melanomas. *Ann. Surg. Oncol.* 12, 449–458.

Khammari, A., Knol, A.C., Nguyen, J.M., Bossard, C., Denis, M.G., Pandolfino, M.C., Quéreux, G., Bercegeay, S., and Dréno, B. (2014). Adoptive TIL transfer in the adjuvant setting for melanoma: long-term patient survival. *J. Immunol. Res.* 2014, 186212.

Kim, Y.J., Ketter, R., Steudel, W.I., and Feiden, W. (2007). Prognostic significance of the mitotic index using the mitosis marker anti-phosphohistone H3 in meningiomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 128, 118–125.

Klabusay, M. (2015). [The Role of Regulatory T-cells in Antitumor Immune Response]. *Uloha Regul. T Bunek v Protinadorove Imunitni Odpovedi*. 28 Suppl 4, 4S23-7.

Koh, G.C.H., Shek, L.P.-C., Goh, D.Y.-T., Van Bever, H., and Koh, D.S.-Q. (2007). Eosinophil cationic protein: Is it useful in asthma? A systematic review. *Respir. Med.* 101, 696–705.

Koller, D.Y., Herouy, Y., Götz, M., Hagel, E., Urbanek, R., and Eichler, I. (1995). Clinical value of monitoring eosinophil activity in asthma. *Arch. Dis. Child.* 73, 413–417.

Kondratiev, S. (2004). Intratumoral CD8+ T Lymphocytes as a Prognostic Factor of Survival in Endometrial Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 10, 4450–4456.

Korabiowska, M., Brinck, U., Middel, P., Brinkmann, U., Berger, H., Radzun, H.J., Ruschenburg, I., and Droese, M. (2000). Proliferative activity in the progression of pigmented skin lesions, diagnostic and prognostic significance. *Anticancer Res.* 20, 1781–1785.

Kraft, S., Fernandez-Figueras, M.T., Richarz, N.A., Flaherty, K.T., and Hoang, M.P. (2017). PDL1 expression in desmoplastic melanoma is associated with tumor aggressiveness and progression. *J. Am. Acad. Dermatol.* 77, 534–542.

Krengel, S., Hauschild, A., and Schafer, T. (2006). Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review. *Br. J. Dermatol.* 155, 1–8.

Krouwels, F.H., Kerstens, L.C., van der Maarel, H.W., Degenhart, H.J., and Neijens, H.J. (1995). Density of eosinophils reflects activity of disease in allergic asthmatic children. *Clin. Exp. Allergy* 25, 1171–1178.

Krückel, A., Moreira, A., Fröhlich, W., Schuler, G., and Heinzerling, L. (2019). Eosinophil-cationic protein - A novel liquid prognostic biomarker in melanoma. *BMC Cancer* 19, 1–7.

Ladányi, A. (2015). Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 28, 490–500.

Ladstein, R.G., Bachmann, I.M., Straume, O., and Akslen, L.A. (2010). Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer* 10, 140.

Ladstein, R.G., Bachmann, I.M., Straume, O., and Akslen, L.A. (2012). Prognostic importance of the mitotic marker phosphohistone H3 in cutaneous nodular melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1247–1252.

Lampinen, M., Rönnblom, A., Amin, K., Kristjansson, G., Rorsman, F., Sangfelt, P., Säfsen, B., Wagner, M., Wanders, A., Winqvist, O., et al. (2005). Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut* 54, 1714–1720.

- Lan, B., Zhang, J., Lu, D., and Li, W. (2016). Generation of cancer-specific CD8+ CD69+ cells inhibits colon cancer growth. *Immunobiology* 221, 1–5.
- Larson, A.R., Konat, E., and Alani, R.M. (2009). Melanoma biomarkers: current status and vision for the future. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 6, 105–117.
- Leong, Anthony S-Y; Cooper, Kumarason; Leong, F.J.W.-M. (2003). *Manual of Diagnostik Cytology 2* (Greenwich Medical Media, Cambridge), pp. 70-75.
- Lesley, J., Hyman, R., and Kincade, P.W. (1993). CD44 and Its Interaction with Extracellular Matrix. *Adv. Immunol.* 54, 271–335.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67, 1030–1037.
- Li, N., Mangini, J., and Bhawan, J. (2002). New prognostic factors of cutaneous melanoma: A review of the literature. *J. Cutan. Pathol.* 29, 324–340.
- Lin, X., Zheng, W., Liu, J., Zhang, Y., Qin, H., Wu, H., Xue, B., Lu, Y., and Shen, P. (2013). Oxidative stress in malignant melanoma enhances tumor necrosis factor- α secretion of tumor-associated macrophages that promote cancer cell invasion. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1337–1355.
- Liu, Y., and Cao, X. (2015). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 1–4.
- Lotfi, R., Lee, J.J., and Lotze, M.T. (2007). Eosinophilic Granulocytes and Damage-associated Molecular Pattern Molecules (DAMPs). *J. Immunother.* 30, 16–28.
- Lotfi, R., Herzog, G.I., DeMarco, R.A., Beer-Stolz, D., Lee, J.J., Rubartelli, A., Schrezenmeier, H., and Lotze, M.T. (2009). Eosinophils Oxidize Damage-Associated Molecular Pattern Molecules Derived from Stressed Cells. *J. Immunol.* 183, 5023–5031.
- Lotfi, R., Kaltenmeier, C., Lotze, M.T., and Bergmann, C. (2016). Until Death Do Us Part: Necrosis and Oxidation Promote the Tumor Microenvironment. *Transfus. Med. Hemotherapy* 43, 120–132.
- Lowe, D., Jorizzo, J., and Hutt, M.S. (1981). Tumour-associated eosinophilia: a review. *J. Clin. Pathol.* 34, 1343–1348.
- Lucarini, V., Ziccheddu, G., Macchia, I., La Sorsa, V., Peschiaroli, F., Buccione, C., Sistigu, A., Sanchez, M., Andreone, S., D’Urso, M.T., et al. (2017). IL-33 restricts tumor growth and inhibits pulmonary metastasis in melanoma-bearing mice through eosinophils. *Oncoimmunology* 6, e1317420.

- MacPherson, J.C., Comhair, S.A.A., Erzurum, S.C., Klein, D.F., Lipscomb, M.F., Kavuru, M.S., Samoszuk, M.K., and Hazen, S.L. (2001). Eosinophils Are a Major Source of Nitric Oxide-Derived Oxidants in Severe Asthma: Characterization of Pathways Available to Eosinophils for Generating Reactive Nitrogen Species. *J. Immunol.* *166*, 5763–5772.
- Matsumoto, K., Appiah-Pippim, J., Schleimer, R.P., Bickel, C.A., Beck, L.A., and Bochner, B.S. (1998). CD44 and CD69 represent different types of cell-surface activation markers for human eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *18*, 860–866.
- Matsumura, Y., and Tarin, D. (1992). Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet (London, England)* *340*, 1053–1058.
- Mattes, J., Hulett, M., Xie, W., Hogan, S., Rothenberg, M.E., Foster, P., and Parish, C. (2003). Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: An eotaxin and STAT6-dependent process. *J. Exp. Med.* *197*, 387–393.
- Mayer, B., Jauch, K.W., Schildberg, F.W., Funke, I., Günthert, U., Figdor, C.G., and Johnson, J.P. (1993). De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* *342*, 1019–1022.
- Melo, R.C.N., Liu, L., Xenakis, J.J., and Spencer, L.A. (2013). Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy* *68*, 274–284.
- Meng, Q., Ying, S., Corrigan, C.J., Wakelin, M., Assoufi, B., Moqbel, R., and Kay, A.B. (1997). Effects of rapamycin, cyclosporin A, and dexamethasone on interleukin 5-induced eosinophil degranulation and prolonged survival. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* *52*, 1095–1101.
- Meng, X., Huang, Z., Teng, F., Xing, L., and Yu, J. (2015). Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treat. Rev.* *41*, 868–876.
- Metcalf, D., Begley, C.G., Johnson, G.R., Nicola, N.A., Vadas, M.A., Lopez, A.F., Williamson, D.J., Wong, G.G., Clark, S.C., and Wang, E.A. (1986). Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* *67*, 37–45.
- de Moll, E.H., Fu, Y., Qian, Y., Perkins, S.H., Wieder, S., Gnjjatic, S., Remark, R., Bernardo, S.G., Moskalenko, M., Yao, J., et al. (2015). Immune biomarkers are more accurate in prediction of survival in ulcerated than in non-ulcerated primary melanomas. *Cancer Immunol. Immunother.* *64*, 1193–1203.
- Moreira, A., Leisgang, W., Schuler, G., and Heinzerling, L. (2017). Eosinophilic count as a biomarker for prognosis of melanoma patients and its importance in the response to immunotherapy. *Immunotherapy* *9*, 115–121.
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van Bossche, J. Den, Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., et al. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res.* *70*, 5728–5739.

Mullol, J., Callejas, F.B., Méndez-Arancibia, E., Fuentes, M., Alobid, I., Martínez-Antón, A., Valero, A., Picado, C., and Roca-Ferrer, J. (2010). Montelukast reduces eosinophilic inflammation by inhibiting both epithelial cell cytokine secretion (GM-CSF, IL-6, IL-8) and eosinophil survival. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 24, 403–411.

Murphy, K.M., Travers, P., and Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie. Grundbegriffe der Immunologie*. Murphy, K.M., Kenneth, M. (Springer Berlin). pp. 3-46, pp. 95-173.

Murray, T., Fuertes Marraco, S.A., Baumgaertner, P., Bordry, N., Cagnon, L., Donda, A., Romero, P., Verdeil, G., and Speiser, D.E. (2016). Very Late Antigen-1 Marks Functional Tumor-Resident CD8 T Cells and Correlates with Survival of Melanoma Patients. *Front. Immunol.* 7, 573.

Nair, P., Ochkur, S.I., Protheroe, C., Radford, K., Efthimiadis, A., Lee, N.A., and Lee, J.J. (2013). Eosinophil peroxidase in sputum represents a unique biomarker of airway eosinophilia. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 68, 1177–1184.

Nasr, M.R., and El-Zammar, O. (2008). Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am. J. Dermatopathol.* 30, 117–122.

Nielsen, P.S., Riber-Hansen, R., Jensen, T.O., Schmidt, H., and Steiniche, T. (2013). Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: Strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. *Mod. Pathol.* 26, 404–413.

Nomi, T., Sho, M., Akahori, T., Hamada, K., Kubo, A., Kanehiro, H., Nakamura, S., Enomoto, K., Yagita, H., Azuma, M., et al. (2007). Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 2151–2157.

Nonaka, M., Nonaka, R., Woolley, K., Adelroth, E., Miura, K., Okhawara, Y., Glibetic, M., Nakano, K., O'Byrne, P., and Dolovich, J. (1995). Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils. *J. Immunol.* 155, 3234–3244.

Ohigashi, Y., Sho, M., Yamada, Y., Tsurui, Y., Hamada, K., Ikeda, N., Mizuno, T., Yoriki, R., Kashizuka, H., Yane, K., et al. (2005). Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 2947–2953.

Ohsie, S.J., Sarantopoulos, G.P., Cochran, A.J., and Binder, S.W. (2008). Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 35, 433–444.

Okazaki, T., and Honjo, T. (2006). The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.* 27, 195–201.

Oršolić, N., Kunštić, M., Kukolj, M., Gračan, R., and Nemrava, J. (2016). Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid. *Chem. Biol. Interact.* 256, 111–124.

- Ostmeier, H., Fuchs, B., Otto, F., Mawick, R., Lippold, A., Krieg, V., and Suter, L. (2001). Prognostic immunohistochemical markers of primary human melanomas. *Br. J. Dermatol.* *145*, 203–209.
- Panagopoulos, V., Zinonos, I., Leach, D.A., Hay, S.J., Liapis, V., Zysk, A., Ingman, W. V., DeNichilo, M.O., and Evdokiou, A. (2015). Uncovering a new role for peroxidase enzymes as drivers of angiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *68*, 128–138.
- Patel, S.P., and Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 847–856.
- Paul, W.E. (2013). *Fundamental immunology* (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins), pp. 5-20.
- Pereira, M.C., Oliveira, D.T., and Kowalski, L.P. (2011). The role of eosinophils and eosinophil cationic protein in oral cancer: A review. *Arch. Oral Biol.* *56*, 353–358.
- Piras, F., Colombari, R., Minerba, L., Murtas, D., Floris, C., Maxia, C., Corby, A., Perra, M.T., and Sirigu, P. (2005). The predictive value of CD8, CD4, CD68 and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* *104*, 1246–1254.
- Poeta, G. Del, Principe, M.I. Del, Zucchetto, A., Luciano, F., Buccisano, F., Rossi, F.M., Bruno, A., Biagi, A., Bulian, P., Maurillo, L., et al. (2012). CD69 is independently prognostic in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive clinical and biological profiling study. *Haematologica* *97*, 279–287.
- Prizment, A.E., Vierkant, R.A., Smyrk, T.C., Tillmans, L.S., Lee, J.J., Sriramaraio, P., Nelson, H.H., Lynch, C.F., Thibodeau, S.N., Church, T.R., et al. (2016). Tumor eosinophil infiltration and improved survival of colorectal cancer patients: Iowa Women's Health Study. *Mod. Pathol.* *29*, 516–527.
- Raap, U., and Wardlaw, A.J. (2008). A new paradigm of eosinophil granulocytes: Neuroimmune interactions. *Exp. Dermatol.* *17*, 731–738.
- Radonjic-Hoesli, S., and Simon, H.-U. (2016). *Allergologie. Eosinophile Granulozyten.* (Springer Berlin Heidelberg), pp. 77–85.
- Reddy, S.S., Hyland, R.H., Alison, R.E., Sturgeon, J.F., and Hutcheon, M.A. (1984). Tumor-associated peripheral eosinophilia: two unusual cases. *J. Clin. Oncol.* *2*, 1165–1169.
- Reichman, H., Karo-Atar, D., and Munitz, A. (2016). Emerging Roles for Eosinophils in the Tumor Microenvironment. *Trends in Cancer* *2*, 664–675.
- Reiser, J., and Banerjee, A. (2016). Effector, Memory, and Dysfunctional CD8+ T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *J. Immunol. Res.* 8941260.

- Ribalta, T., McCutcheon, I.E., Aldape, K.D., Bruner, J.M., and Fuller, G.N. (2004). The mitosis-specific antibody anti-phosphohistone-H3 (PHH3) facilitates rapid reliable grading of meningiomas according to WHO 2000 criteria. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, 1532–1536.
- Robert Koch Institut (2015): Robert Koch Institut Zentrum für Krebsregisterdaten. Online:https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Krebsregisterdaten/krebs_node.html, Stand: 07.09.2016.
- Rosenberg, H.F., Ackerman, S.J., and Tenen, D.G. (1989). Human eosinophil cationic protein. Molecular cloning of a cytotoxin and helminthotoxin with ribonuclease activity. *J. Exp. Med.* 170, 163–176.
- Roth, N., Städler, S., Lemann, M., Hösli, S., Simon, H.-U., and Simon, D. (2011). Distinct eosinophil cytokine expression patterns in skin diseases - the possible existence of functionally different eosinophil subpopulations. *Allergy* 66, 1477–1486.
- Van Royen, N., Voskuil, M., Hoefer, I., Jost, M., De Graaf, S., Hedwig, F., Andert, J.P., Wormhoudt, T.A.M., Hua, J., Hartmann, S., et al. (2004). CD44 Regulates Arteriogenesis in Mice and Is Differentially Expressed in Patients with Poor and Good Collateralization. *Circulation* 109, 1647–1652.
- Sagiv, J.Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., Damti, P., Lumbroso, D., Polyansky, L., Sionov, R. V., et al. (2015). Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.* 10, 562–573.
- Sahni, P., Patel, A., Md, S., Hallur, J., and Gujjar, P.K. (2015). Tumor Associated Tissue Eosinophilia in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Histo-Chemical Analysis. *Malays. J. Med. Sci.* 22, 21–25.
- Sakkal, S., Miller, S., Apostolopoulos, V., and Nurgali, K. (2016). Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? *Curr. Med. Chem.* 23, 650–666.
- Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F.L., Penault-Llorca, F., et al. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. *Ann. Oncol.* 26, 259–271.
- Sanchez-cabo, F., Ph, D., Costes, A., Molidor, R., Ph, D., Mlecnik, B., Sc, M., Kirilovsky, A., Sc, M., Nilsson, M., et al. (2005). Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2654–2666.
- Sancho, D., Gómez, M., and Sánchez-Madrid, F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 26, 136–140.
- Sano, K., Yamauchi, K., Hoshi, H., Honma, M., Tamura, G., and Shirato, K. (1997). CD44 expression on blood eosinophils is a novel marker of bronchial asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114, 67–71.

- Schimming, T.T., Grabellus, F., Roßner, M., Pechlivanis, S., Sucker, A., Bielefeld, N., Moll, I., Schadendorf, D., and Hillen, U. (2012). PHH3 immunostaining improves interobserver agreement of mitotic index in thin melanomas. *Am. J. Dermatopathol.* 34, 266–269.
- Schmid-Wendtner, M.H., Baumert, J., Schmidt, M., Plewig, G., Volkenandt, M., and Hölzel, D. (2001). Prognostic index for cutaneous melanoma: An analysis after follow-up of 2715 patients. *Melanoma Res.* 11, 619–626.
- Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311–322.
- Schonk, D.M., Kuijpers, H.J.H., van Drunen, E., van Dalen, C.H., Geurts van Kessel, A.H.M., Verheijen, R., and Ramaekers, F.C.S. (1989). Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum. Genet.* 83, 297–299.
- Schwartz, E., Cruickshank, F.A., Perlish, J.S., and Fleischmajer, R. (1989). Alterations in Dermal Collagen in Ultraviolet Irradiated Hairless Mice. *J. Invest. Dermatol.* 93, 142–146.
- Screaton, G.R., Bell, M. V, Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., and Bell, J.I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 12160–12164.
- Sekar, D., Hahn, C., Brüne, B., Roberts, E., and Weigert, A. (2012). Apoptotic tumor cells induce IL-27 release from human DCs to activate Treg cells that express CD69 and attenuate cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 42, 1585–1598.
- Senovilla, L., Vacchelli, E., Galon, J., Adjemian, S., Eggermont, A., Fridman, W.H., Sautès-Fridman, C., Ma, Y., Tartour, E., Zitvogel, L., et al. (2012). Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology* 1, 1323–1343.
- Sharma, P., Shen, Y., Wen, S., Yamada, S., Jungbluth, A.A., Gnjjatic, S., Bajorin, D.F., Reuter, V.E., Herr, H., Old, L.J., et al. (2007). CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3967–3972.
- Shi, H.-Z. (2004). Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* 76, 520–527.
- Shim, E.-J., Chun, E., Lee, H.-S., Bang, B.-R., Cho, S.-H., Min, K.-U., and Park, H.-W. (2015). Eosinophils Modulate CD4 + T Cell Responses via High Mobility Group Box-1 in the Pathogenesis of Asthma. *Allergy. Asthma Immunol. Res.* 7, 190.
- da Silva, J.M., Queiroz-Junior, C.M., Batista, A.C., Rachid, M.A., Teixeira, M.M., and da Silva, T.A. (2014). Eosinophil depletion protects mice from tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. *Histol. Histopathol.* 29, 387–396.

- Simon, S.C.S., Utikal, J., and Umansky, V. (2019). Opposing roles of eosinophils in cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 68, 823–833.
- Simson, L., Ellyard, J.I., Dent, L.A., Matthaei, K.I., Rothenberg, M.E., Foster, P.S., Smyth, M.J., and Parish, C.R. (2007). Regulation of Carcinogenesis by IL-5 and CCL11: A Potential Role for Eosinophils in Tumor Immune Surveillance. *J. Immunol.* 178, 4222–4229.
- Skaland, I., Janssen, E.A.M., Gudlaugsson, E., Klos, J., Kjellevold, K.H., Søliland, H., and Baak, J.P.A. (2007). Phosphohistone H3 expression has much stronger prognostic value than classical prognosticators in invasive lymph node-negative breast cancer patients less than 55 years of age. *Mod. Pathol.* 20, 1307–1315.
- Starska, K., Głowacka, E., Kulig, A., Lewy-Trenda, I., Bryś, M., and Lewkowicz, P. (2011). Prognostic value of the immunological phenomena and relationship with clinicopathological characteristics of the tumor - The expression of the early CD69+, CD71+ and the late CD25+ CD26+, hla/dr+ activation markers on t CD4+ and CD8+ lymphocytes in squamo. *Folia Histochem. Cytobiol.* 49, 593–603.
- Straetemans, T., Berrevoets, C., Coccoris, M., Treffers-Westerlaken, E., Wijers, R., Cole, D.K., Dardalhon, V., Sewell, A.K., Taylor, N., Verweij, J., et al. (2015). Recurrence of melanoma following T cell treatment: continued antigen expression in a tumor that evades T cell recruitment. *Mol. Ther.* 23, 396–406.
- Sun, J., Law, G.P., and McKallip, R.J. (2012). Role of CD44 in lymphokine-activated killer cell-mediated killing of melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 323–334.
- Takei, H., Bhattacharjee, M.B., Rivera, A., Dancer, Y., and Powell, S.Z. (2007). New Immunohistochemical Markers in the Evaluation of Central Nervous System Tumors A Review of 7 Selected Adult and Pediatric Brain Tumors. *Arch Pathol Lab Med—VolArch Pathol Lab Med* 131131, 234–241.
- Tamura, T., Ohira, M., Tanaka, H., Muguruma, K., Toyokawa, T., Kubo, N., Sakurai, K., Amano, R., Kimura, K., Shibutani, M., et al. (2015). Programmed death-1 ligand-1 (PDL1) expression is associated with the prognosis of patients with stage II/III gastric cancer. *Anticancer Res.* 35, 5369–5376.
- Taube, J.M., Klein, A., Brahmer, J.R., Xu, H., Pan, X., Kim, J.H., Chen, L., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., and Anders, R.A. (2014). Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin. Cancer Res.* 20, 5064–5074.
- Ten, R.M., Pease, L.R., McKean, D.J., Bell, M.P., and Gleich, G.J. (1989). Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J. Exp. Med.* 169, 1757–1769.
- Tetzlaff, M.T., Curry, J.L., Ivan, D., Wang, W.L., Torres-Cabala, C.A., Bassett, R.L., Valencia, K.M., McLemore, M.S., Ross, M.I., and Prieto, V.G. (2013). Immunodetection of phosphohistone H3 as a surrogate of mitotic figure count and clinical outcome in cutaneous melanoma. *Mod. Pathol.* 26, 1153–1160.

Thapa, R., and Wilson, G.D. (2016). The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells Int.* 2016, 2087204.

Thomas, N.E., Busam, K.J., From, L., Kricker, A., Armstrong, B.K., Anton-Culver, H., Gruber, S.B., Gallagher, R.P., Zanetti, R., Rosso, S., et al. (2013). Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J. Clin. Oncol.* 31, 4252–4259.

Tomassini, M., Tsicopoulos, A., Tai, P.C., Gruart, V., Tonnel, A.B., Prin, L., Capron, A., and Capron, M. (1991). Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88, 365–375.

Trautinger, F., Mazzucco, K., Knobler, R.M., Trenz, A., and Kokoschka, E.-M. (1994). UVA- and UVB-induced changes in hairless mouse skin collagen. *Arch. Dermatol. Res.* 286, 490–494.

Utsunomiya, A., Ishida, T., Inagaki, A., Ishii, T., Yano, H., Komatsu, H., Iida, S., Yonekura, K., Takeuchi, S., Takatsuka, Y., et al. (2007). Clinical significance of a blood eosinophilia in adult T-cell leukemia/lymphoma: A blood eosinophilia is a significant unfavorable prognostic factor. *Leuk. Res.* 31, 915–920.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 9, 1269–1274.

Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligiel, S.E.G., Datta, S.C., Wang, Z.Q., Shao, Y., Kang, S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2001). Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am. J. Pathol.* 158, 931–942.

Varricchi, G., Galdiero, M.R., Loffredo, S., Lucarini, V., Marone, G., Mattei, F., Marone, G., and Schiavoni, G. (2018). Eosinophils: The unsung heroes in cancer? *Oncoimmunology* 7, 1–14.

Venge, P., and Byström, J. (1998). Molecules in focus eosinophil cationic protein (ECP). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 433–437.

Venge, P., Håkansson, L., and Peterson, C.G. (1987). Eosinophil activation in allergic disease. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 82, 333–337.

Venge, P., Byström, J., Carlson, M., Håkansson, L., Karawaczyk, M., Peterson, C., Sevéus, L., and Trulsson, A. (1999). Eosinophil cationic protein (ECP): Molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin. Exp. Allergy* 29, 1172–1186.

Wada, T., Matsuda, Y., Toma, T., Koizumi, E., Okamoto, H., and Yachie, A. (2016). Increased CD69 Expression on Peripheral Eosinophils from Patients with Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 170, 201–205.

Wagner, N.B., Weide, B., Reith, M., Tarnanidis, K., Kehrel, C., Lichtenberger, R., Pflugfelder, A., Herpel, E., Eubel, J., Ikenberg, K., et al. (2015). Diminished levels of the soluble form of RAGE are related to poor survival in malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 137, 2607–2617.

Wang, H., Dai, Y., Wang, J., Yang, X., and Jiang, X. (2015). Anti-CD69 monoclonal antibody treatment inhibits airway inflammation in a mouse model of asthma. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 16, 622–631.

Wang, Z., DiDonato, J.A., Buffa, J., Comhair, S.A., Aronica, M.A., Dweik, R.A., Lee, N.A., Lee, J.J., Thomassen, M.J., Kavuru, M., et al. (2016). Eosinophil Peroxidase Catalyzed Protein Carbamylation Participates in Asthma. *J. Biol. Chem.* 291, 22118–22135.

Von Wasielewski, R., Seth, S., Franklin, J., Fischer, R., Hübner, K., Hansmann, M.L., Diehl, V., and Georgii, A. (2000). Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood* 95, 1207–1213.

Weide, B., Martens, A., Hassel, J.C., Berking, C., Postow, M.A., Bisschop, K., Simeone, E., Mangana, J., Schilling, B., Di Giacomo, A.M., et al. (2016). Baseline biomarkers for outcome of melanoma patients treated with pembrolizumab. *Clin. Cancer Res.* 22, 5487–5496.

Wiecker, T.S., Luther, H., Buettner, P., Bauer, J., and Garbe, C. (2003). Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer* 97, 628–638.

Wlaschek, M., Tantcheva-Poór, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L.A., Razi-Wolf, Z., Schüller, J., and Scharffetter-Kochanek, K. (2001). Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 63, 41–51.

Xu, H., Tian, Y., Yuan, X., Wu, H., Liu, Q., Pestell, R.G., and Wu, K. (2015). The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development. *Onco. Targets. Ther.* 8, 3783–3792.

Yang, W., Chen, P.W., Li, H., Alizadeh, H., and Niederkorn, J.Y. (2008). PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 2518–2525.

Yoshimura, C., Yamaguchi, M., Iikura, M., Izumi, S., Kudo, K., Nagase, H., Ishii, A., Walls, A.F., Ra, C., Iwata, T., et al. (2002). Activation markers of human basophils: CD69 expression is strongly and preferentially induced by IL-3. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 817–823.

- Young, J.D., Peterson, C.G., Venge, P., and Cohn, Z.A. (1986). Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 321, 613–616.
- Zayour, M., and Lazova, R. (2011). Congenital melanocytic nevi. *Clin. Lab. Med.* 31, 267–280.
- Zbytek, B., Carlson, J.A., Granese, J., Ross, J., Mihm, M., and Slominski, A. (2008). Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev. Dermatol.* 3, 569–585.
- Zederbauer, M., Furtmueller, P.G., Brogioni, S., Jakopitsch, C., Smulevich, G., and Obinger, C. (2007). Heme to protein linkages in mammalian peroxidases: impact on spectroscopic, redox and catalytic properties. *Nat. Prod. Rep.* 24, 571–584.
- Zhao, Q., Kuang, D.M., Wu, Y., Xiao, X., Li, X.F., Li, T.J., and Zheng, L. (2012). Activated CD69+ T cells foster immune privilege by regulating IDO expression in tumor-associated macrophages. *J Immunol* 188, 1117–1124.
- Ziegler, S.F., Ramsdell, F., Hjerrild, K.A., Armitage, R.J., Grabstein, K.H., Hennen, K.B., Farrah, T., Fanslow, W.C., Shevach, E.M., and Alderson, M.R. (1993). Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *Eur. J. Immunol.* 23, 1643–1648.
- Zikich, D., Schachter, J., and Besser, M.J. (2016). Predictors of tumor-infiltrating lymphocyte efficacy in melanoma. *Immunotherapy* 8, 35–43.
- Zrinski, Renata Topic, Dodig, S. (2011). Eosinophil cationic protein – current concepts and controversies. *Biochem. Medica* 21, 65–67.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Eosinophiler Granulozyt	8
Abbildung 2	Antitumoraler Effekt von Eosinophilen.....	10
Abbildung 3	Mikroskopische Darstellung von TMA2 (ECP+ eingefärbt)	23
Abbildung 4	Fotographien der Gewebeschnitte nach Immunhistochemischer Färbung	27
Abbildung 5	ECP+ gefärbte Schnitte zweier Primärmelanome von TMA2 mit ausgezählten eosinophilen Granulozyten.....	28
Abbildung 6	ECP+ gefärbte eosinophile Granulozyten auf einem Gewebeschnitt einer Hautmetastase von TMA2 mit NPD.view2.....	29
Abbildung 7	Analyse eines CD8+ eingefärbten Gewebeschnitts eines Primärmelanoms von TMA1 mit NPD.view2.....	35
Abbildung 8	CD8+ Zellen intratumoral	36
Abbildung 9	CD8+ Zellen in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden	37
Abbildung 10	Analyse eines CD69+ eingefärbten Gewebeschnitts einer Lymphknotenmetastase von TMA2 mit NPD.view2.....	38
Abbildung 11	CD69+ Zellen intratumoral	39
Abbildung 12	CD69+ Zellen in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden	40
Abbildung 13	Analyse eines CD44+ eingefärbten Gewebeschnitts einer Hautmetastase von TMA2 mit NPD.view2.....	41
Abbildung 14	CD44+ Zellen intratumoral	42
Abbildung 15	CD44+ Zellen in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden	43
Abbildung 16	Analyse eines ECP+ eingefärbten Gewebeschnitts eines Primärmelanoms von TMA2 mit NPD.view2.....	44
Abbildung 17	ECP+ Zellen intratumoral	45
Abbildung 18	ECP+ Zellen in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden	46
Abbildung 19	Analyse eines EPX+ eingefärbten Gewebeschnitts einer Hautmetastase von TMA2 mit NPD.view2.....	47
Abbildung 20	EPX+ Zellen intratumoral	48
Abbildung 21	EPX+ Zellen in Abhängigkeit vom kutanen Photoschaden	49

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Zeitstrahl des Forschungsfortschritts zu eosinophilen Granulozyten anhand ausgewählter Publikationen.....	12
Tabelle 2	Verwendete Primärantikörper	24
Tabelle 3	Verwendete Chemikalien.....	24
Tabelle 4	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 5	Verwendete Geräte.....	25
Tabelle 6	Verwendete Software	25
Tabelle 7	Beispielhafte Auswertung eines ECP Schnittes von TMA2	30
Tabelle 8	Charakteristika des Patientenkollektivs und der TMA	33

9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname:	Barthels, Josephine Eve
Geburtsdatum:	01.11.1993
Geburtsort:	Bad Homburg v.d. Höhe
Familienstand:	ledig
Vater:	Guido Barthels
Mutter:	Michaela Barthels (geb. Weber)

SCHULISCHER WERDEGANG

2003 – 2007	Kaiserin-Friedrich-Gymnasium, Bad Homburg v.d. Höhe, Deutschland
2007 – 2008	Deutsche Schule London, Richmond, London, England
2008 – 2009	Grey Court School, Richmond, London, England
2009 – 2012	Kaiserin-Friedrich-Gymnasium, Bad Homburg v.d. Höhe, Deutschland
06.06.2012	Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2012/13	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
03.09.2014	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
12.10.2017	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
06.06.2019	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)
08.07.2019	Approbation als Ärztin

10 DANKSAGUNG

Die vorliegende Studie wurde im Jahr 2015 von der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität als Dissertation angenommen. Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen und Institutionen hätte sie in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Utikal danken, der meine Arbeit stets mit fachlicher Expertise und konstruktiven Anregungen unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Gebhardt für die Überlassung des Themas, fortwährenden Rückmeldungen und emotionalen Beistand. Ich danke ihm für die inhaltliche Ausrichtung und thematische Eingrenzung dieser Arbeit. Durch sein großes Engagement, professionelle Hilfe und investierte Zeit hat Prof. Dr. Gebhardt wesentlich zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke der Arbeitsgruppe Gebhardt, der Klinik für Dermatologie an der Universitätsmedizin Mannheim sowie der NCT Gewebebank des Pathologischen Instituts am Universitätsklinikum Heidelberg für die Zurverfügungstellung der Patientendaten und der Gewebeschnitte. Für die Unterstützung bei der Immunhistochemie danke ich besonders Sayran Arif-Said vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

Danken möchte ich außerdem meinen Mitstudenten, die mich im Rahmen des Studiums und auf dem Weg dieser Dissertation begleitet und moralisch unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Freund, ohne dessen unermüdliche Unterstützung die vorliegende Studie nicht möglich gewesen wäre. Ihnen ist diese Studie gewidmet.